

**Untersuchungen  
zur Isopentenylpyrophosphat-Isomerase**

**Isolierung, Bestimmung und Hemmung der Isomerase aus Hefe  
Isolierung der Prenyltransferase aus Hefe**

**Martin Elhardt**

**1975**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41551925\\_0078](https://archive.org/details/IA41551925_0078)



Untersuchungen zur Isopentenylpyrophosphat-Isomerase

Isolierung, Bestimmung und Hemmung der Isomerase aus Hefe  
Isolierung der Prenyltransferase aus Hefe

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches  
Chemie und Pharmazie  
der  
Ludwig-Maximilian-Universität  
München

vorgelegt  
von  
Martin Elhardt

München  
1975



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Iynen  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann  
Tag der Promotion: 28.7.1975

Meinen Eltern



Die vorliegende Arbeit wurde von September 1968 bis Juli 1973 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof.Dr.F.Lynen am Institut für Biochemie der Universität München und am Max-Planck-Institut für Zellchemie durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.F.Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit und mir stets gewährte.

Frau Emilia Müller, geb.Fischer, danke ich für die zuverlässige, geschickte und wertvolle Mitarbeit in den Jahren 1971 und 1972.

Ferner möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen danken, die durch Diskussionen und praktische Hilfe diese Arbeit ermöglichten und unterstützten.



## Gliederung

|                                                              | <u>Seite</u> |
|--------------------------------------------------------------|--------------|
| A <u>Einleitung</u> .....                                    | 1            |
| B <u>Allgemeiner Teil</u> .....                              | 8            |
| I) <u>Enzymbestimmung</u> .....                              | 8            |
| 1. Vorbemerkung.....                                         | 8            |
| 2. Radioaktive Bestimmungsmethode I .....                    | 9            |
| 3. Radioaktive Bestimmungsmethode II .....                   | 9            |
| a) Abhängigkeit von der Isomerase-Konzentration...           | 10           |
| b) Abhängigkeit von der Transferase-Konzentration.           | 10           |
| c) Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration...           | 12           |
| d) Zeitabhängigkeit .....                                    | 12           |
| e) Abhängigkeit vom pH-Wert .....                            | 12           |
| f) Identifizierung der Endprodukte .....                     | 14           |
| g) Hydrolyse des gebildeten Farnesyl-PP .....                | 16           |
| 4. Fluorimetrische Bestimmungsmethoden                       |              |
| Vorbemerkungen .....                                         | 17           |
| 5. Fluorimetrische Bestimmungsmethode I .....                | 18           |
| 6. Fluorimetrische Bestimmungsmethode II .....               | 19           |
| 7. Fluorimetrische Bestimmungsmethode III .....              | 21           |
| 8. Prenyltransferase-Bestimmung .....                        | 21           |
| II) <u>Reinigung der Isopentenylpyrophosphatisomerase</u> .. | 22           |
| 1. Toluol-Aufschluß .....                                    | 22           |
| 2. Reinigung mit Aluminiumoxid-Gel .....                     | 23           |
| 3. Entfernung der Nukleinsäuren .....                        | 25           |
| 4. Fällung mit Diammoniumhydrogenphosphat .....              | 26           |
| 5. Gelfiltration an Sephadex G 100 .....                     | 26           |
| 6. Affinitätschromatographie .....                           | 30           |
| 7. Chromatographie an DEAE-Cellulose .....                   | 32           |
| 8. Isoelektrische Fokussierung in Sephadex .....             | 34           |
| III) <u>Eigenschaften der IPP-Isomerase</u> .....            | 37           |
| 1. Bestimmung des isoelektrischen Punktes .....              | 37           |
| 2. Molekulargewichtsbestimmung durch                         |              |
| SDS-Elektrophorese .....                                     | 38           |
| 3. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration.          | 40           |

|                                                                               | <u>Seite</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4. Hemmversuche .....                                                         | 40           |
| a) Hemmung mit Diäthylpyrocarbonat .....                                      | 40           |
| b) Hemmung mit 5-Diazo-1-H-tetrazol .....                                     | 42           |
| c) Hemmung mit N-(N'-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-<br>-maleinimid ( ASPM ) ..... | 42           |
| d) Inhibierung durch Puffersubstanzen .....                                   | 44           |
| IV) <u>Zusammenfassung und Diskussion</u> .....                               | 45           |
| V) <u>Reinigung der Prenyltransferase</u> .....                               | 50           |
| 1. Aufschluß der Hefe .....                                                   | 50           |
| 2. Erste Fällung mit Ammoniumsulfat .....                                     | 51           |
| 3. Reinigung mit Aluminiumoxid-Gel .....                                      | 51           |
| 4. Zweite Ammoniumsulfat-Fällung .....                                        | 52           |
| 5. Gelfiltration an Sephadex G 200 .....                                      | 52           |
| 6. DEAE-Cellulose-Chromatographie .....                                       | 54           |
| 7. Aufbewahrung der Transferase .....                                         | 56           |
| VI) <u>Eigenschaften der Prenyltransferase</u> .....                          | 58           |
| 1. pH-Einfluß auf die Aktivität .....                                         | 58           |
| 2. Hemmungen .....                                                            | 58           |
| 3. Isoelektrischer Punkt .....                                                | 59           |
| 4. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration<br>an Sephadex .....       | 60           |
| C <u>Experimenteller Teil</u> .....                                           | 62           |
| I) <u>Allgemeine Verfahren</u> .....                                          | 62           |
| 1. Verwendete Apparate .....                                                  | 62           |
| 2. Enzyme, Substrate, Chemikalien .....                                       | 63           |
| 3. Proteinbestimmung .....                                                    | 64           |
| 4. Radioaktivitätsmessung .....                                               | 64           |
| 5. Gaschromatographie .....                                                   | 64           |
| II) <u>Enzymbestimmungen</u> .....                                            | 66           |
| 1. Synthese von 1-C- <sup>14</sup> -Isopentenylpyrophosphat ...               | 66           |
| 2. IPP-Reinigung durch Ionenaustausch-<br>chromatographie .....               | 68           |
| 3. Enzymbestimmungsmethoden .....                                             | 70           |
| a) Isomerase .....                                                            | 70           |
| Radioaktive Bestimmungsmethode .....                                          | 70           |

|                                                                                              | <u>Seite</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Fluorimetrische Methode I .....                                                              | 70           |
| Fluorimetrische Methode II .....                                                             | 71           |
| b) Transferase .....                                                                         | 71           |
| III) <u>Reinigung der IPP-Isomerase</u> .....                                                | 72           |
| 1. Aufschluß mit Toluol .....                                                                | 72           |
| 2. Adsorption an Aluminiumoxid-Gel .....                                                     | 72           |
| 3. Fällung mit Streptomycinsulfat und<br>Fraktionierung mit Diammoniumhydrogenphosphat. .... | 72           |
| 4. Gelfiltration .....                                                                       | 73           |
| 5. Chromatographie an DEAE-Cellulose .....                                                   | 74           |
| 6. Affinitätschromatographie .....                                                           | 75           |
| IV) <u>Hemmung der Isomerase</u> .....                                                       | 75           |
| 1. Hemmung mit Diäthylpyrocarbonat .....                                                     | 75           |
| 2. Hemmung mit 5-Diazo-1-H-tetrazol .....                                                    | 75           |
| 3. Hemmung mit ASPM .....                                                                    | 76           |
| V) <u>Anreicherung der Prenyltransferase</u> .....                                           | 76           |
| 1. Aufschluß .....                                                                           | 76           |
| 2. Erste Ammoniumsulfatfällung .....                                                         | 77           |
| 3. Reinigung mit Aluminiumoxid-Gel .....                                                     | 77           |
| 4. Zweite Ammoniumsulfatfällung .....                                                        | 77           |
| 5. Sephadex-G-200-Filtration .....                                                           | 77           |
| 6. Chromatographie an DEAE-Cellulose .....                                                   | 78           |
| VI) <u>Molekulargewichtsbestimmung nach der</u><br><u>Sephadex-Methode</u> .....             | 78           |
| VII) <u>Elektrophoresen</u> .....                                                            | 79           |
| 1. Papierelektrophorese .....                                                                | 79           |
| 2. Säulenelektrophorese .....                                                                | 79           |
| 3. Diskelektrophorese .....                                                                  | 79           |
| 4. SDS-Diskelektrophorese auf Polyacrylamid-Gel .                                            | 80           |
| VIII) <u>Isoelektrische Fokussierung</u> .....                                               | 82           |
| 1. Säulenisoelektrofokussierung .....                                                        | 82           |
| 2. Diskisoelektrofokussierung .....                                                          | 82           |
| 3. Dünnschichtisoelektrofokussierung .....                                                   | 83           |
| D <u>Zusammenfassung</u> .....                                                               | 85           |
| E <u>Literaturverzeichnis</u> .....                                                          | 86           |

## Verwendete Abkürzungen

|                   |                                                                |
|-------------------|----------------------------------------------------------------|
| AE                | Aktivitätseinheiten                                            |
| ASPM              | N-(N'-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleinimid                     |
| ATP               | Adenosin-5'-triphosphat                                        |
| DEAE              | Diäthylaminoäthyl-Rest                                         |
| DMAPP             | Dimethylallylpyrophosphat                                      |
| EDTA              | Äthylendiamintetraessigsäure                                   |
| FPP               | Farnesylpyrophosphat                                           |
| G-1-P             | Glucose-1-phosphat                                             |
| G-6-P             | Glucose-6-phosphat                                             |
| IEP               | isoelektrischer Punkt                                          |
| IMP               | Isopentenylmonophosphat                                        |
| IPP               | Isopentenylpyrophosphat                                        |
| Imp.              | Impulse                                                        |
| JAA               | Jodacetamid                                                    |
| NADP <sup>+</sup> | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, oxydiert              |
| NEM               | N-Äthyl-maleinimid                                             |
| NPGS              | Neopentylglycolsuccinat                                        |
| 6-PGDH            | 6-Phosphogluconat-dehydrogenase                                |
| PGluM             | Phosphoglucomutase                                             |
| PP                | Pyrophosphat                                                   |
| SDS               | Natriumdodecylsulfat                                           |
| Skt.              | Skalenteile                                                    |
| TCA               | Trichloressigsäure                                             |
| TEMED             | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin                             |
| Tris              | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                               |
| UDPG              | Uridin-5'-diphosphoglucose                                     |
| UTP               | Uridin-5'-triphosphat                                          |
| $\beta$ -Wert:    | Verhältnis der Extinktion bei 280 nm zur Extinktion bei 260 nm |

## A) Einleitung

Das bei Mensch und Tier am häufigsten anzutreffende Steroid, das Cholesterin, wird von allen Geweben, hauptsächlich jedoch von der Leber synthetisiert. Die Bedeutung entspricht der weiten Verbreitung, z.B. als Vorstufe der Steroidhormone oder der Gallensäuren oder als Bestandteil der Galle, aus der es sich bei gestörtem Verhältnis zwischen Cholesterin, Lecithin und gallensauren Salzen als "Cholesterinstein" abscheidet. 1775 wurde dieses Steroid von Conradi in den Gallensteinen entdeckt.

Nach Aufklärung der Struktur des Cholesterins, besonders unter Beteiligung von Windaus (Lit. 1) und Wieland (Lit. 2) gewann der Syntheseweg Interesse:

In Experimenten an Hefe zeigten 1937 Sonderhoff und Thomas (Lit. 3), daß radioaktiv markiertes Acetat vollständig in die Sterine der Hefe eingebaut wird. Bloch (Lit. 4) konnte diese Entdeckung um die Erkenntnis erweitern, daß alle 27 Kohlenstoffatome des Cholesterins ihren Ursprung in Essigsäure haben und überdies, ergänzt durch Untersuchungen von Popják und Cornforth (Lit. 5), die Verteilung der C-Atome der Methyl- und Carboxylgruppe des Ausgangsproduktes Essigsäure im Endprodukt festlegen.

Weitere Arbeiten zur Erstellung des Biosyntheseweges führten zum Nachweis von Squalen als Zwischenprodukt durch den Arbeitskreis Bloch (Lit. 6), die Entdeckung der Mevalonsäure durch Folkers (Lit. 7), die Identifizierung von Isopentenylpyrophosphat als Vorstufe des Zwischenproduktes Farnesylpyrophosphat (Lit. 8), die Erkennung des Bedarfs an ATP, NADPH und Magnesiumionen zur Synthese von Squalen (Lit. 9) u.a.

Ein abgekürztes Schema der Biosynthese ist in Abb. 1 angegeben.

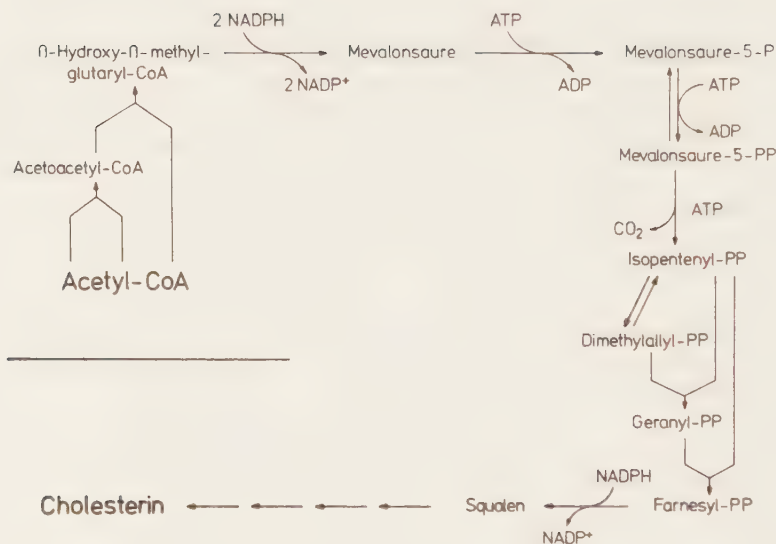


Abb. 1 Der Weg der Biosynthese der Terpene

Aus drei Molekülen Acetyl-CoA wird durch Kondensation  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA gebildet, das auch durch den Leucinabbau über Isovaleryl-CoA entstehen kann. Unter NADPH-Verbrauch erfolgt Reduktion zur Mevalonsäure, die mit ATP pyrophosphoryliert wird. Es schließt sich unter weiterem ATP-Verbrauch eine Decarboxylierung zu Isopentenylpyrophosphat an. Durch die IPP-Isomerase wird dieses Zwischenprodukt in Dimethylallylpyrophosphat umgewandelt, das als Starter für die Kondensationsreaktion der Farnesylpyrophosphatsynthetase (Prenyltransferase) dient, die unter Pyrophosphat-abspaltung mit weiterem Isopentenyl-PP Farnesyl-PP bildet. Durch Kopf-an-Kopf-Verknüpfung zweier Farnesylpyrophosphate entsteht Squalen als Vorläufer für das Cholesterin-Gerüst.

Die Zwischenprodukte Isopentenyl-PP und Dimethylallyl-PP enthalten beide die von Ruzicka (Lit. 10) in seiner "Isoprenregel" geforderte Isopreneinheit und stellen somit die

Ausgangsprodukte für die Synthese einer Reihe wichtiger Naturstoffe dar.

Das die Isomerisierungsreaktion katalysierende Enzym, die IPP-Isomerase (Prenyl-Isomerase), das auf Grund seiner Empfindlichkeit gegenüber Jodacetamid entdeckt wurde, hat also die Aufgabe, den Starter für die Kondensationsreaktion, das Dimethylallyl-PP mit der in Allylstellung stehenden, leicht abspaltbaren Pyrophosphatgruppe, zur Verfügung zu stellen.

1959 berichteten Agranoff und Lynen (Lit. 11) über die erste Anreicherung der IPP-Isomerase aus Bäckerhefe, wiesen jedoch bereits auf den höheren Gehalt dieses Enzyms in der Leber hin. Auf Grund der Hemmung des Enzyms durch Jodacetamid und p-Chlormercuribenzoat (bei letzterem Hemmstoff gelingt teilweise Reaktivierung des Enzyms mit reduziertem Glutathion) zogen sie den Schluß, daß die SH-Gruppe eines Cystein-Restes an der Reaktion unter intermediärer Bildung einer Thioätherbrücke beteiligt wäre, wie es in Abb. 2a formuliert wurde. Als Vergleich wurde das in Katzenharn entdeckte Felinin (Abb. 2b) angeführt, dessen Bildung aus Mevalonsäure bewiesen war. Ein weiterer Hinweis für den Mechanismus war die von Eggerer (Lit. 12) gefundene, unter verhältnismäßig milden Bedingungen ablaufende Synthese von Felininphosphat aus Cystein und Isopentenylmonophosphat.

Lengsfeld (Lit. 13) führte die Arbeiten von Agranoff fort mit der Anreicherung der Isomerase aus Bäckerhefe und mit Versuchen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus.



Ähnliche Versuche wurden von Lengsfeld durchgeführt. Da sich jedoch das Enzym nicht ausreichend mit C-14-Substrat beladen ließ und nur geringe Mengen an Enzym zur Verfügung standen, mußte auf die Isolierung des radioaktiven Anlagerungsproduktes verzichtet werden.

Selbst eine kovalente Bindung des Hydrolysenproduktes des Substrates (oder seines Umwandlungsproduktes) an das denaturierte Protein könnte durch Hydrolyse von bereits gebildeten DMAPP durch Perchlorsäure bzw. Trichloressigsäure und dadurch Bildung eines reaktiven Kations, das mit vielen nukleophilen Gruppen reagieren kann, verursacht sein. Eine Isolierung und genaue Analyse dürfte deshalb unerläßlich sein, um zuverlässige Angaben über den Ort der Anlagerung zu gewinnen.

Lengsfeld kam bei Hemmversuchen (Lit. 13) zu dem Ergebnis, daß das Substrat IPP die Isomerase nicht vor der Hemmung durch JAA schützt, sondern im Gegenteil die Reaktion des Enzyms mit dem Inhibitor fördert. Andererseits schienen dem Messungen über Beladungsversuche mit C-14-Jodacetamid zu widersprechen, die bei Substratanwesenheit eine deutlich geringere Reaktion mit dem Hemmstoff ergaben. Um beide Resultate widerspruchsfrei zu verbinden, wurde von Lengsfeld der Schluß gezogen, daß im aktiven Zentrum der Isomerase eine zweite Thiolgruppe anzunehmen ist, die durch Zusatz von Substrat gegen Jodacetamid geschützt werden kann. Die Reaktion von nur einer der SH-Gruppen führt jedoch bereits zur Inaktivierung des Enzyms. In Abb. 3 ist der Vorschlag Lengsfelds zum Aufbau des aktiven Zentrums wiedergegeben, wobei  $C_1 - C_4$  das Kohlenstoffskelett des IPP-Moleküls in Richtung der  $C_3 - C_5$  -Achse betrachtet, darstellt.  $S_x$  sei eine SH-Gruppe, die zur Bildung eines intermediären Thioäthers nach dem Vorschlag Lynens dienen soll;  $S_y$  sei eine SH-Gruppe, die an der Protonübertragung mitwirkt.

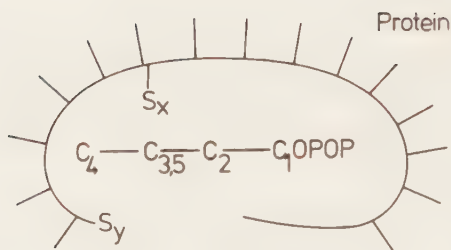


Abb. 3 Vorschlag von H.J. Lengsfeld (Lit. 13) zur Struktur des aktiven Zentrums der Isomerase

Cornforth (Lit. 18) versuchte das Problem vom räumlichen Ablauf der Reaktion her zu lösen. Mit Hilfe von stereospezifisch markierten Verbindungen klärte er die Stereochemie der Isomerase-Reaktion für das Enzym aus Schweineleber auf, ohne jedoch auf die Beteiligung der katalytisch aktiven Gruppen im einzelnen einzugehen. Das Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Lengsfeld und sagt aus, daß aus räumlichen Gründen zwei Gruppen an der Reaktion beteiligt sein müssen, die sich im aktiven Zentrum gegenüberstehen, wie es in Abb. 4 nach dem Vorschlag von Cornforth dargestellt ist.

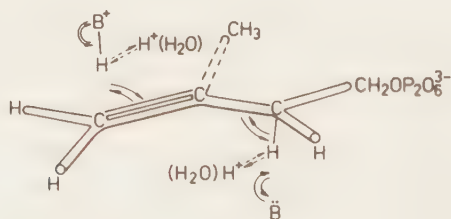


Abb. 4 Vorschlag von Cornforth (Lit. 18) zur Isomerisierungsreaktion

Zur genauen Analyse und zur Durchführung von Beladungsversuchen mit anschließender Isolierung von Zwischenprodukten ist es nötig, größere Mengen des Enzyms zu reinigen. Mit den in Kapitel B II beschriebenen Versuchen wurde deshalb unter Abänderung der von Lengsfeld angeführten Anreicherung (Tabelle 1) ein Weg zur Reinigung der Isomerase aus Bäckerhefe ausgearbeitet. Zuvor war es jedoch nötig, empfindlichere und schnellere Möglichkeiten zur Enzymbestimmung zu entwickeln (Kapitel B I), zu deren Ausführung als Hilfsenzym die Farnesylpyrophosphat-Synthetase, die im folgenden als Prenyltransferase bezeichnet wird, anzureichern war (Kapitel B V). Abschließend werden einige Versuche beschrieben, die Auskunft über die Eigenschaften und die enzymatische Reaktion der Isomerase geben sollen (Kapitel B III).

#### Tabelle 1

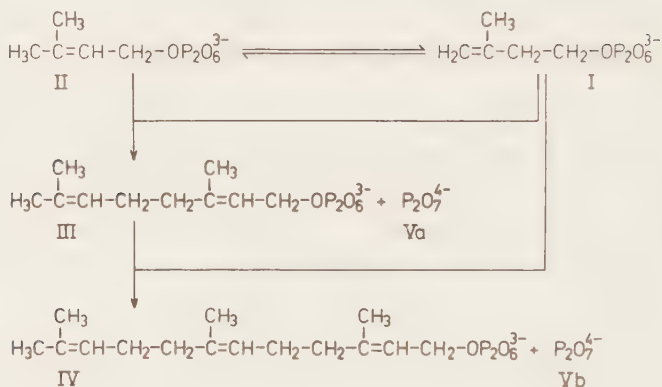
Reinigungsschritte für die Isomerase nach Lit. 13

1. Aufschluß
2. Dialyse
3. Gelschritt
4. Ammoniumphosphatfällung
5. Manganchloridfällung
6. Hitzedenaturierung
7. Ammoniumsulfatfällung
8. Trägerfreie Elektrophorese
9. DEAE-Cellulose-Chromatographie

## B) Allgemeiner Teil

### I) Enzymbestimmung

#### 1. Vorbemerkung



**Abb. 5** Reaktionsschema der Bildung von Farnesylpyrophosphat (IV) aus Dimethylallylpyrophosphat (II) und Isopentenylpyrophosphat (I)

In Isopentenylpyrophosphat (I) wird durch die IPP-Isomerase eine Doppelbindung verschoben. Das entstehende DMAPP (II) dient als Starter für die Kondensationsreaktion der Prenyltransferase (Farnesylpyrophosphat-Synthetase), die unter Abspaltung von Pyrophosphat (V) das DMAPP mit weiterem IPP zu Geranyl-PP (III) und dann zu Farnesyl-PP (IV) umsetzt. Eine weitere Kondensation zu Geranylgeranyl-PP findet nur in sehr geringem Maße statt (Lit. 19).

In DMAPP, Geranyl-PP und Farnesyl-PP befindet sich die Pyrophosphatgruppe im Gegensatz zum Ausgangssubstrat IPP in Allylstellung, so daß sie durch Säuren leicht abgespalten werden kann.

## 2. Radioaktive Bestimmungsmethode I

DMAPP wird durch die Einwirkung von Säuren sofort in Pyrophosphat und Dimethylallylalkohol, bzw. Dimethylvinylcarbinol gespalten. Beide organische Verbindungen lassen sich mit Petroläther aus dem Testreaktionsgemisch abtrennen. Verwendet man nun C-14-IPP, so kann das umgesetzte Substrat nach Hydrolyse aus dem Reaktionsgemisch leicht entfernt, das zurückbleibende C-14-IPP gemessen und aus dessen Abnahme die Enzymaktivität berechnet werden. Aus Untersuchungen von Lengsfeld geht hervor, daß der Verbrauch an C-14-IPP nur bis etwa 15 % Substratumsatz dem zugesetzten Enzym proportional ist, so daß Aktivitätsbestimmungen in diesem Bereich durchgeführt werden müssen. Damit ergibt sich, daß die Enzymaktivität durch Differenzbildung aus zwei nur um maximal 15 % voneinander abweichenden Werten ermittelt wird. Geringe Fehler in der Substratkonzentration oder Radioaktivitätsmessung ergeben deshalb verhältnismäßig große Fehler für die Enzymaktivität.

Diese Bestimmungsmethode wurde von Agranoff (Lit. 11) und Lengsfeld (Lit. 13) beschrieben und durchgeführt.

Will man jedoch die aus dem umgesetzten Substrat mit Säure freigesetzten organischen Produkte bestimmen (Lit. 16), so muß man berücksichtigen, daß teilweise flüchtige Kohlenwasserstoffe entstehen und dann der Messung entgehen können.

## 3. Radioaktive Bestimmungsmethode II

Wie DMAPP wird Farnesyl-PP durch Säuren gespalten. Läßt man nun durch Zusatz eines Überschusses an Prenyltransferase das durch die Isomerase gebildete DMAPP sofort mit IPP zu Farnesyl-PP kondensieren, so läßt sich daraus eine empfindliche Methode zur Enzymbestimmung ableiten.

Für jedes umgesetzte Molekül C-14-IPP erhält man ein Molekül Farnesyl-PP mit der dreifachen Anzahl von C-14-Atomen. Durch Säurezusatz freigesetzte organische Produkte (Farnesol, Nerolidol, Kohlenwasserstoffe) können mit Petroläther abgetrennt und gemessen werden.

Zur Durchführung dieser Bestimmungsmethode, die bei der vorliegenden Arbeit bevorzugt verwendet wurde, war es jedoch nötig, zuvor zur Reinigung der Prenyltransferase und Abtrennung der Isomerase einen Anreicherungsang auszuarbeiten (Beschreibung S. 50).

Als Substrat wurde 1-C-14-IPP eingesetzt (Herstellung und Reinigung siehe experimenteller Teil S. 66). Durch Zusatz von Trichloressigsäure wurde die enzymatische Reaktion beendet und gleichzeitig säurelabile Reaktionsprodukte hydrolysiert. Die entstandenen organischen Stoffe wurden nach Zugabe von Kalilauge mit einem Gemisch aus Petroläther und Äthanol extrahiert und deren Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Um die optimalen Bedingungen für den Enzymtest festzulegen, wurden folgende Abhängigkeiten des kombinierten Tests gemessen:

a) Abhängigkeit von der Isomerase-Konzentration (Abb. 6)

Nach einem linearen Anstieg erhält man einen unbrauchbaren Verlauf der Kurve. IPP wurde im Überschuß zugegeben, jedoch wurde entstandenes DMAPP durch Transferase-Mangel nicht mehr vollständig zu Farnesyl-PP kondensiert.

b) Abhängigkeit von der Transferase-Konzentration (Abb. 7)

In einem weiten Bereich ist der Einfluß der Transferase-Menge gering. Ohne Zusatz wird, wie aus Abb. 5 (Seite 8) zu fordern ist, nur etwa ein Drittel des maximalen Wertes an Radioaktivität erhalten.

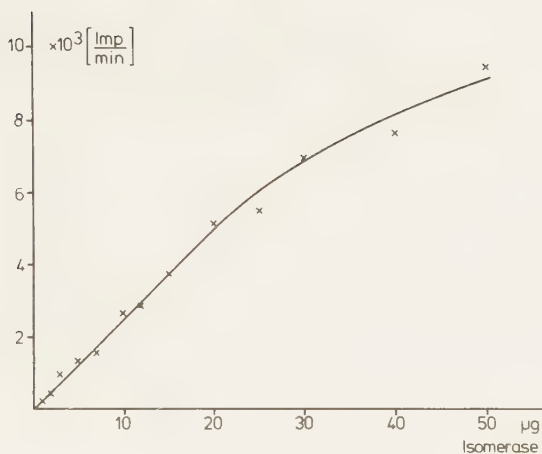


Abb. 6 Enzymabhängigkeit von IPP-Isomerase nach radioaktiver Methode II

(Ordinate: Radioaktivität der beim Test unter den auf S.70 beschriebenen Bedingungen extrahierbaren organischen Stoffe; Ausführung siehe exp. Teil S.70  
Transferase: 400  $\mu\text{g}$ )

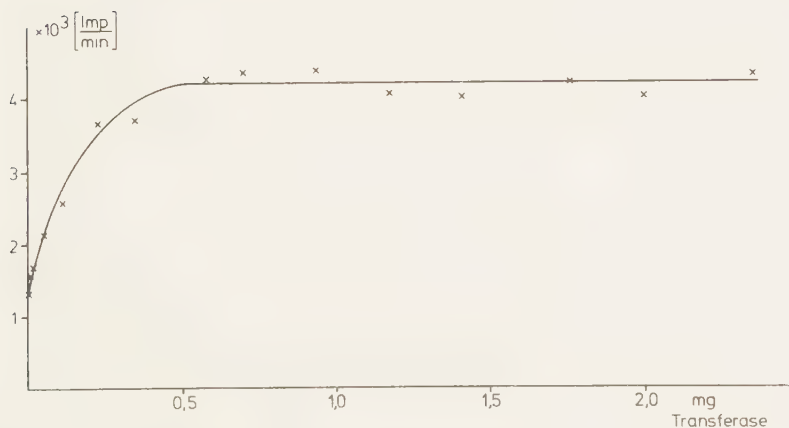


Abb. 7 Transferase-Abhängigkeit des Isomerase-Tests (radioaktive Methode II)

(Ordinate wie Abb. 6; Ausführung siehe exp. Teil S.70  
Isomerase: 20  $\mu\text{g}$ )

c) Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration (Abb. 8)

Da die Reaktion beider Enzyme von der Anwesenheit des Co-faktors Magnesium abhängig ist, muß eine ausreichende Konzentration an Magnesiumionen beim Test eingesetzt werden.

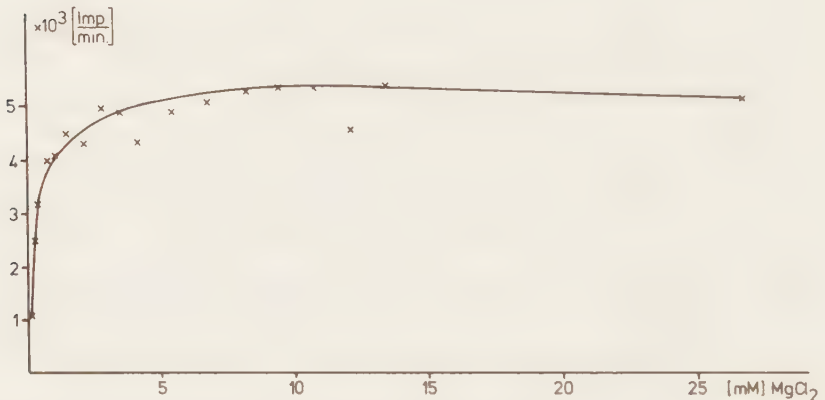


Abb. 8 Magnesiumionen-Abhängigkeit des Isomerase-Tests  
(radioaktive Methode II)  
(Ordinate wie Abb. 6; Ausführung siehe exp. Teil S.70 )

d) Zeitabhängigkeit (Abb. 9)

Für den durchgeführten Test wurde eine Inkubationszeit von 10 min festgelegt, die völlig innerhalb des linearen Bereichs der Kurve liegt.

e) Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 10)

Im Gegensatz zu Agranoff (Lit. 11) wurde kein breites pH-Optimum erhalten. Da Agranoff für die pH-Werte 7,6 und 8,1 den die enzymatische Reaktion hemmenden Phosphatpuffer (siehe S.44 ) angibt, dürfte die tatsächliche Aktivität bei den beiden Werten höher gewesen sein.

Als pH-Wert für den kombinierten Test wurde 7,5 gewählt, da oberhalb dieses Wertes die Transferase-Aktivität stark abnimmt (Abb. 29, S.58 , pH-Optimum der Transferase).

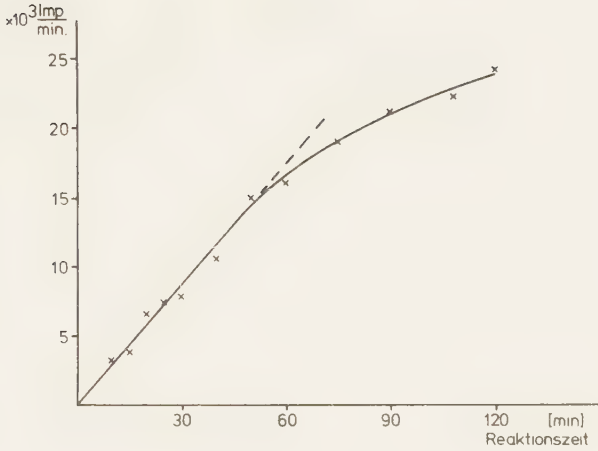


Abb. 9 Zeitabhängigkeit des Isomerase-Tests (radioaktive Methode II)  
(Ordinate wie Abb. 6; Ausführung siehe exp. Teil S.70 )

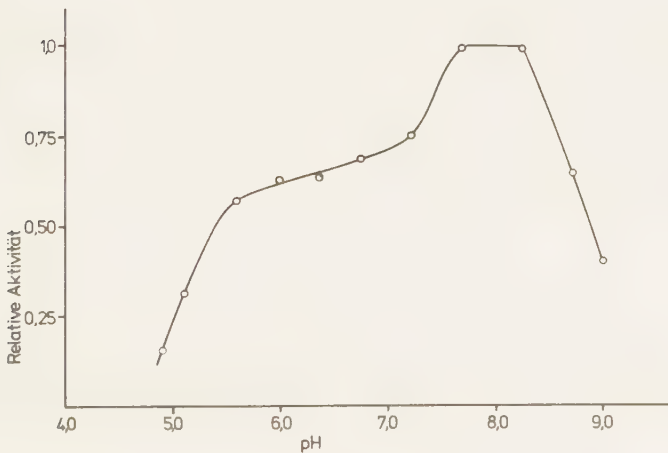


Abb. 10 pH-Abhängigkeit des Isomerase-Tests (radioaktive Methode II)  
(Puffer: Tris/Acetat; die gleichen Ergebnisse wurden erhalten bei Verwendung von Acetat-Puffer von 5,0 bis 6,5 und Tris/HCl-Puffer von 6,9 bis 8,8; Ausführung siehe exp. Teil S.70 )

f) Identifizierung der Endprodukte (Abb. 11)

Die durch die Synthese entstandenen Produkte wurden durch Gaschromatographie identifiziert:

A) Massengaschromatogramm eines Gemisches käuflicher Terpenalkohole:

- 1 Isopentenol
- 2 Dimethylallylalkohol
- 3 Linalool
- 4 Geraniol
- 5 Nerolidol
- 6 Farnesol
- 7 Geranyllinalool
- 8 Geranylgeraniol

(Die kleinen Gipfel sind durch Verunreinigungen der Terpenalkohole entstanden.)

- B) Radiogaschromatogramm, das nach Spaltung der Reaktionsprodukte mit Phosphatase erhalten wurde. Dabei erscheint Isopentenol (aus nicht umgesetzten IPP) und Farnesol (aus FPP).
- C) Radiogaschromatogramm, das nach saurer Spaltung der Reaktionsprodukte erhalten wurde. Dabei erscheint der Hauptteil in der C-15-Fraktion (Farnesol, Nerolidol), geringe Mengen in der C-10-Fraktion, jedoch keine Radioaktivität in der C-5-Fraktion. (Das Auftreten geringer Mengen in der C-10-Fraktion deutet auf einen geringen Mangel an Transferase hin, so daß entstandenes DMAPP nicht vollständig in Farnesyl-PP umgewandelt wurde.)

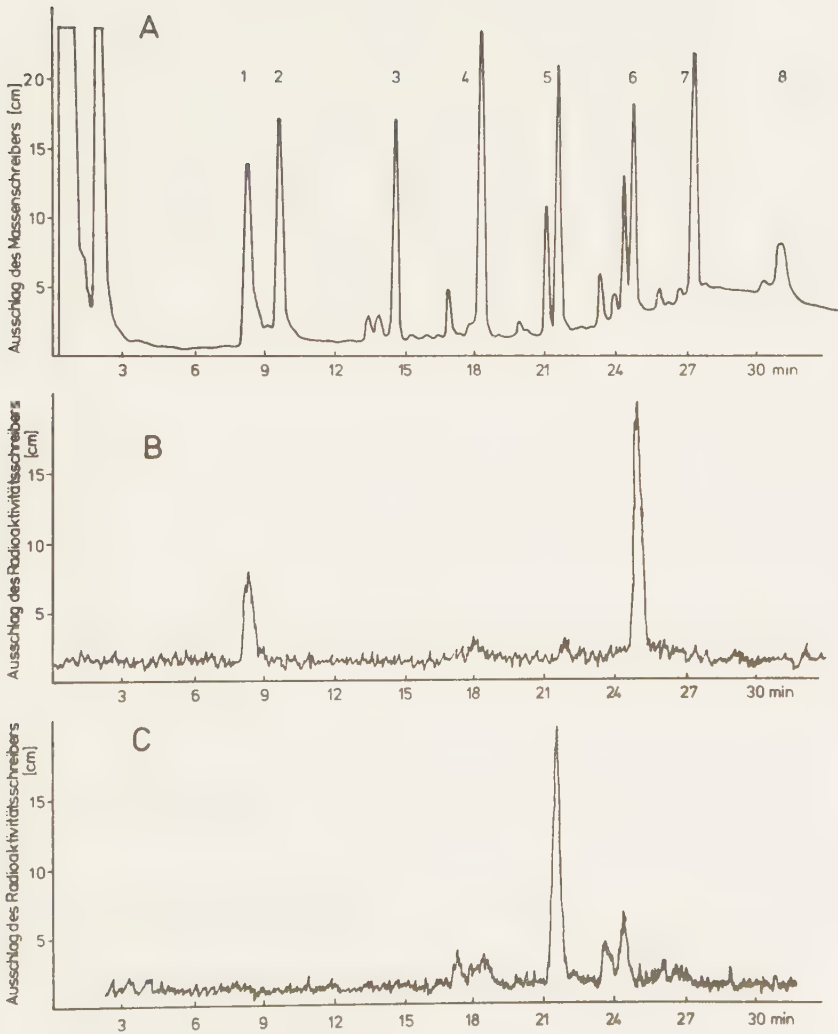


Abb. 11 Gaschromatographische Analyse der mit Petroläther  
extrahierbaren radioaktiven Verbindungen  
(Erläuterungen S. 14  
Durchführung s. experiment. Teil S. 64)

g) Hydrolyse des gebildeten Farnesyl-PP (Abb. 12)

Zur Bestimmung der Hydrolysedauer erschien es wichtig, die Hydrolyse des entstandenen Farnesyl-PP in Abhängigkeit von der Zeit unter den verwendeten Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurde der Test unter Zusatz von enzymatisch synthetisiertem C-14-Farnesyl-PP mit wechselnder Hydrolysedauer durchgeführt. Nach etwa 5 min. wird keine weitere Spaltung in petrolätherlösliche Stoffe mehr beobachtet; es können jedoch nur etwa 85 % der eingesetzten Radioaktivität zurück-erhalten werden.

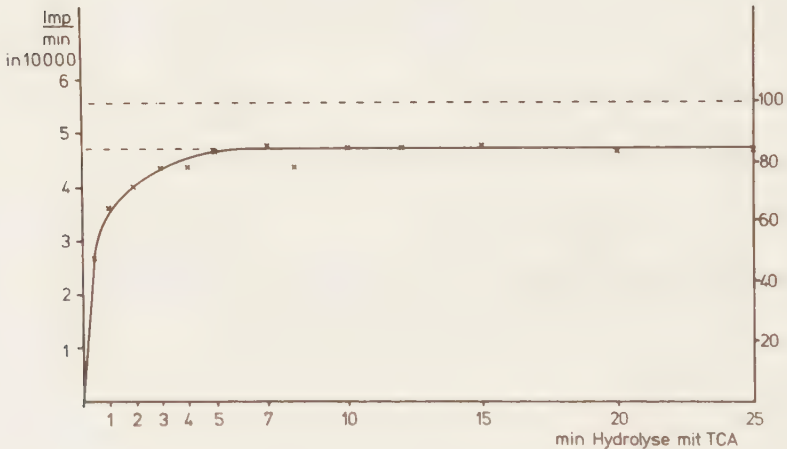


Abb. 12 Zeitabhängigkeit der Hydrolyse von Farnesyl-PP unter den Bedingungen der Testdurchführung (Ordinate links: Radioaktivität der nach der Hydrolyse mit Petroläther extrahierbaren Verbindungen; Ordinate rechts: Radioaktivität der extrahierbaren Verbindungen in Prozent der Radioaktivität der eingesetzten Verbindung )

#### 4. Fluorimetrische Bestimmungsmethoden - Vorbemerkungen

Bei der Spaltung von DMAPP mit Säuren wird Pyrophosphat freigesetzt. Dieses läßt sich quantitativ bestimmen nach R.E.Reeves (Lit. 20) oder R.J.Guillory (Lit. 21) über eine Folge enzymatischer Reaktionen, wofür jedoch die Anreicherung weiterer Enzyme nötig wäre, so daß es zunächst nicht sinnvoll erschien, diese Möglichkeit näher zu untersuchen.

Eine weitere Reaktionsfolge zur Pyrophosphatbestimmung (ähnlich der von R.J.Guillory angegebenen Methode), bei der alle Enzyme und Substrate genügend rein zu erhalten sind, ermöglichte es, eine Bestimmungsmethode für die Isomerase und die Transferase auszuarbeiten.

Dazu wird folgende Reaktionskette durchgeführt (Abb. 13, Lit. 22)

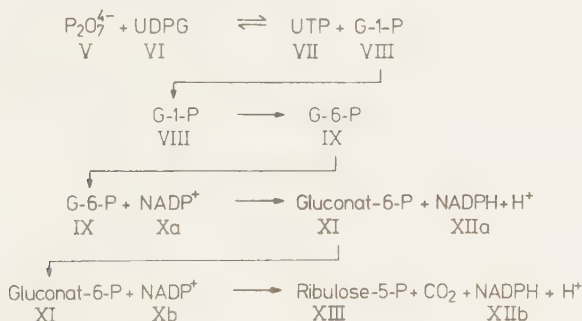


Abb. 13 Reaktionsschema zur Bestimmung der Pyrophosphatkonzentration im fluorimetrischen Test

Pyrophosphat (V) wird mit Uridin-5'-diphosphoglucose (VI) (UDPG) durch die UDPG-Pyrophosphorylase umgesetzt zu Uridin-5'-triphosphat (VII) und Glucose-1-phosphat (VIII), das durch die Phosphoglucumutase isomerisiert wird zu Glucose-6-phosphat (IX). Dieses wird mit  $\text{NADP}^+$  durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase oxidiert zu Gluconat-6-phosphat (XI). Das dabei entstehende NADPH (XIIa) kann durch Messung im Fluorimeter bestimmt werden.

Die Empfindlichkeit der Methode kann erhöht werden durch Zusatz von 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, durch die Gluconat-6-phosphat unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung zu Ribulose-5-phosphat (XIII) umgewandelt wird. Dabei entsteht wieder NADPH (XIb).

#### 5. Fluorimetrische Bestimmungsmethode I

IPP wird wie bei der radioaktiven Bestimmungsmethode durch Isomerase umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion und Hydrolyse des entstandenen DMAPP mit Säure wird in aliquoten Teilen der Lösung nach Neutralisation die Pyrophosphatkonzentration gemessen. Die Isomerase-Reaktion braucht dabei nicht vollständig unterbunden zu sein, da ein Gehalt an IPP oder DMAPP keinen Einfluß auf die Pyrophosphatmessung zeigt.

Für diesen Test wird die Transferase nicht benötigt. Es kann deshalb der Einfluß vieler Bedingungen (ausgenommen Hemmstoffwirkungen) auf die Isomerase untersucht werden, ohne daß, wie bei Methode II, der Einfluß anderer Enzyme berücksichtigt werden muß. Der Zeitaufwand für eine Bestimmung ist jedoch ähnlich hoch wie für eine der radioaktiven Methoden.

Die Enzymabhängigkeit, gemessen nach dieser Methode, ist in Abb. 14 wiedergegeben.

Die Empfindlichkeitssteigerung durch Zusatz von 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase läßt sich in diesem Fall anwenden. Dabei wird bei gleicher Isomerase-Menge etwa der doppelte Wert erhalten.

Das entstandene NADPH wird durch Fluoreszenz-Messung quantitativ bestimmt. Bei einer Anregung bei den Wellenlängen 313 und 366 nm wurde die Fluoreszenzintensität im Bereich 420 bis 3000 nm gemessen.

Im Gegensatz zur Extinktion ist die Fluoreszenzintensität keine molare Größe. Da ihr Wert abhängig ist von der Intensität der anregenden Lichtquelle und von der Konstruktion des verwendeten Gerätes, muß das Fluorimeter geeicht werden. Dafür wurden bei der fluorimetrischen Methode I Pyrophosphatlösungen be-

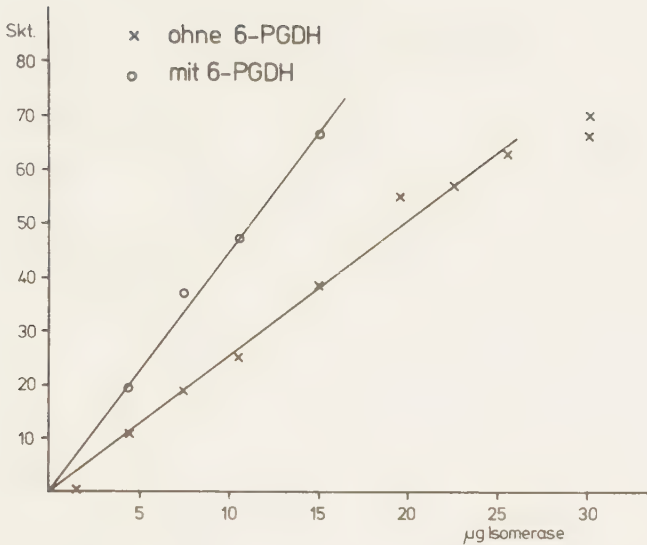


Abb. 14 Enzymabhängigkeit nach fluorimetrischer Methode I  
(Fluorimetrische Messung der NADPH-Endkonzentration,  
Ausführung S.70 )

- a) ohne Zusatz von 6-PGDH:  
Endprodukt: Gluconat-6-phosphat
- b) mit Zusatz von 6-PGDH:  
Endprodukt: Ribulose-5-phosphat

kannter Konzentrationen zugesetzt, während es bei der Methode II sinnvoll erschien, die Eichung durch Festlegung von Meßpunkten über die radioaktive Methode durchzuführen.

## 6. Fluorimetrische Methode II

Bei der Kondensation von DMAPP mit zwei Molekülen IPP zu Farnesyl-PP werden zwei Moleküle Pyrophosphat abgespalten, deren Bildung über die angegebene Reaktionsfolge durch Zusatz der entsprechenden Substrate und Enzyme kontinuierlich fluorimetrisch bestimmt werden kann. Im Gegensatz zur Methode I erfolgt die Messung durch Verfolgung der zeitlichen Fluoreszenzänderung. Nach Vorinkubation, bei der geringe Pyrophosphatver-

unreinigungen des eingesetzten IPP abreagieren können, wird die Reaktion durch Zusatz der Isomerase gestartet.

Dabei ergibt sich für die Enzymabhängigkeit folgendes Bild:

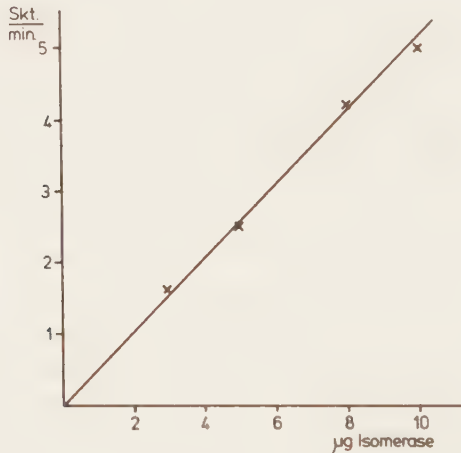


Abb. 15 Enzymabhängigkeit nach fluorimetrischer Methode II  
( Fluorimetrische Messung der Geschwindigkeit der  
NADPH-Bildung, Ausführung S. 71 )

Diese Methode ist vor allem geeignet zur schnellen Bestimmung des Enzyms in Säuleneluat. Der Test läßt sich wesentlich rascher durchführen als die bereits beschriebenen Methoden.

Da sich jedoch jede Änderung der Testdurchführung auf alle zugesetzten Enzyme ( IPP-Isomerase, Prenyltransferase, UDPG-Pyrophosphorylase, Phosphoglucomutase, G6P-dehydrogenase ) auswirkt, kann der Test nur unter eng begrenzten Bedingungen durchgeführt werden. Er kann deshalb nicht verwendet werden, um den Einfluß von Hemmstoffen, pH-Wert usw. auf die Isomerase zu untersuchen. Gleichzeitig muß durch die Diffusion der Substrate von Enzym zu Enzym mit größeren Ungenauigkeiten gerechnet werden, wenn mehrere Enzyme beteiligt sind.

### 7. Fluorimetrische Methode III

Die fluorimetrischen Methoden I und II lassen sich verbinden zu einer weiteren Methode:

Nach der Kondensation von IPP und DMAPP zu Farnesyl-PP unter Bildung von Pyrophosphat erfolgt die Aufarbeitung wie bei Methode I durch saure Hydrolyse. Da Farnesyl-PP wie DMAPP säureempfindlich ist, wird ein weiteres Molekül Pyrophosphat freigesetzt, das zusammen mit den bei der Kondensation entstandenen quantitativ bestimmt werden kann.

Diese Methode wurde nicht untersucht.

### 8. Prenyltransferase-Bestimmung

Die Aktivitätsbestimmung der Transferase kann analog der Isomerase erfolgen ( Lit. 13, 23 ):

Nach Hemmung von Isomerase-Verunreinigungen mit Jodacetamid und Zusatz von DMAPP als Starter-Molekül für die Kondensation wird die Bestimmung wie bei der radioaktiven Methode II durchgeführt.

Die Anwendung der fluorimetrischen Methode II auf die Transferase wurde nicht untersucht.

Dabei bestünden folgende Möglichkeiten:

- 1) Zusatz von IPP und genügend Isomerase zur Bildung von DMAPP ( Ein Überschuß an gebildetem DMAPP würde nicht stören, da nur das bei der Kondensation gebildete PP gemessen wird; jedoch sind die bei der fluorimetrischen Methode II für die Isomerase beschriebenen Einschränkungen zu beachten ! )
- 2) Zusatz von IPP und DMAPP ( das jedoch nur schwer vollständig von PP-Verunreinigungen zu befreien ist )

In beiden Fällen könnte das bei der Kondensation entstehende Pyrophosphat gemessen werden.

Diese Methoden sollten sich auch ohne Jodacetamidzusatz auf Isomerase-haltige Transferaselösungen anwenden lassen.

## II) Reinigung der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase

Als Ausgangsmaterial wurde käufliche Bäckerhefe verwendet. Zur Reinigung der Isomerase konnten die Ergebnisse von Lengsfeld (Lit. 13) nur teilweise übernommen werden, da vor allem bei der Folge: Manganchloridfällung, Hitzedenaturierung und Ammoniumsulfatfällung nur 25 % Ausbeute bei dreifacher Anreicherung über alle drei Stufen zu erzielen waren.

Neu eingeführte Schritte sind: Streptomycinsulfat-Fällung, Gelfiltration an Sephadex G 100, isoelektrische Fokussierung in Sephadex.

### 1. Toluol-Aufschluß

Wie schon von Lengsfeld beobachtet wurde, können große Schwankungen in der spezifischen Aktivität je nach Alter der Hefe auftreten. Ein Vergleich zwischen "frischer" Hefe, die den normalen Lieferweg durchlaufen hatte (A), und gleicher Hefe, die sofort nach dem Abpacken, also ohne Lagerzeit beim Hersteller oder Lieferanten, verarbeitet wurde (B), brachte folgendes Ergebnis:

Spezifische Aktivität

A) Aufschluß nach 100 h Lagerung 0,0092 AE/mg Protein

B) Aufschluß nach 5 h Lagerung 0,020 AE/mg Protein

(Aufschluß und Test wurden in beiden Fällen genau gleich ausgeführt.)

Um möglichst hohe Ausgangsaktivität zu erhalten, sollte die Hefe also sofort verarbeitet werden.

Die höchste spezifische Enzymaktivität trat beim Aufschluß mit Toluol nach Lengsfeld auf. Variation der Bedingungen (pH-Wert, Zeitdauer, Vorinkubation bei 37° C) brachten keine Verbesserung.

Andere Aufschlußmethoden, z.B. im Hochdruckhomogenisator nach Manton-Gaulin oder im Zellhomogenisator nach Merckenschlager, führten zwar zu etwa doppelter Gesamtaktivität, gleichzeitig stieg jedoch die Gesamtproteinausbeute auf den vierfachen Wert, wodurch ein entsprechendes Absinken der spezifischen Aktivität verursacht wurde. Das Lengsfeldsche Verfahren wurde

deshalb ausschließlich durchgeführt.

Nach Aufschluß der Hefezellen wurde der abzentrifugierte Überstand vor der Adsorption an Aluminiumoxid-Gel dialysiert. Dabei wurde eine Dauer von 12 bis 14 Stunden nicht überschritten, da dann ein rascher Abfall der Aktivität eintrat, der durch teilweise Hydrolyse verursacht sein könnte (Lit. 24).

Bedingt durch die gegenüber den Lengsfeldschen Angaben unvollständigere Dialyse war zur Einstellung eines pH-Wertes von 6,2 eine größere Menge Essigsäure nötig; es wurde jedoch kein negativer Einfluß auf die Adsorption beobachtet.

## 2. Reinigung mit Aluminiumoxid-Gel

Durch Adsorption an Aluminiumoxid-Gel und nachfolgende Elution konnte die Isomerase vom Hauptteil der Prenyltransferase getrennt werden, da diese unter den angewandten Bedingungen nicht adsorbiert wird (s. S.51 ).

Die Desorption mit 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH = 7,0) führte zu folgendem Ergebnis (Abb. 16):

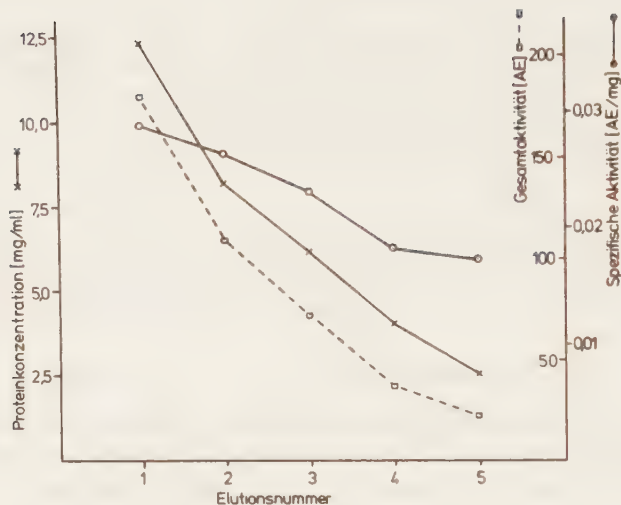


Abb. 16 Elution der Isomerase aus Aluminiumoxid-Gel mit 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH = 7,0)  
Abhängigkeit der Proteinkonzentration, der spezifischen Aktivität und der Gesamtaktivität von der Zahl der Elutionen (Verhältnis Protein:Gel = 2:1)

Nach der vierten Elution erschien es nicht mehr ratsam, weiteres Protein aus dem Gel zu desorbieren, da die spezifische Aktivität sowie die Proteinausbeute bereits zu stark abgenommen hatten. Ebenso war ein Absinken des  $\beta$ -Wertes auf etwa 0,58, also ein Ansteigen des Nukleinsäuregehaltes zu beobachten (als  $\beta$ -Wert wurde das Verhältnis der Extinktion bei 280 nm zur Extinktion bei 260 nm bezeichnet).

Versuche mit Calciumphosphat-Gel nach Lit. 25 brachten das gleiche Ergebnis.

Da sich Nukleinsäurekomplexe besonders leicht in salzarmen Lösung bilden, schloß sich als Vorbereitung zur Fällung der Nukleinsäuren mit Streptomycinsulfat eine Dialyse an, deren Dauer wieder auf maximal 12 Stunden beschränkt wurde.

### 3. Entfernung der Nukleinsäuren

Um den hohen Nukleinsäuregehalt nach dem Gelschritt zu verringern, wurde eine Fällung mit Streptomycinsulfat durchgeführt.

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen wurden Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentration mit steigenden Mengen Streptomycinsulfat versetzt, der entstehende Niederschlag nach kurzem Rühren abzentrifugiert.

Die günstigsten Ergebnisse wurden erhalten bei Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 20 mg/ml. Der Nukleinsäuregehalt ließ sich dabei von ca. 17 - 20 % auf 2 - 3 % verringern (jeweils errechnet aus der Absorption bei 260 und 280 nm).

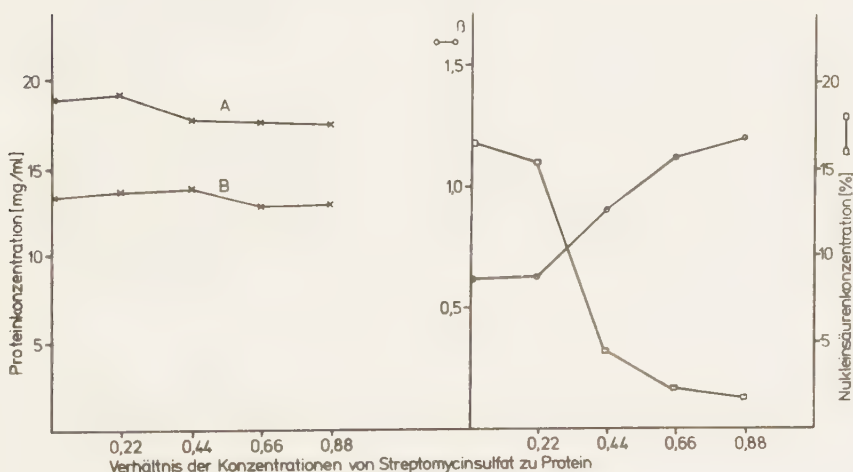


Abb. 17 a) Abhängigkeit der Proteinkonzentration vom Zusatz an Streptomycinsulfat (Proteinanfangskonzentration: A) 19 mg/ml B) 13,4 mg/ml)  
b) Abhängigkeit der Nukleinsäurekonzentration vom Zusatz an Streptomycinsulfat (für beide Proteinkonzentrationen A und B wurden die gleichen Ergebnisse erhalten)

Nach der Dialyse des aus dem Aluminiumoxid-Gel desorbierten Proteins wurden Konzentrationen von etwa 10 mg/ml erhalten, so daß diese Lösungen ohne weiteres verwendet werden können. Bei einem Verhältnis von 0,7 - 0,8 mg Streptomycinsulfat pro mg Protein - der bei den Anreicherungen zugesetzten Menge - blieben die Proteinmenge und die spezifische Aktivität fast unverändert, während der größte Teil der Nukleinsäuren entfernt wurde.

#### 4. Fällung mit Diammoniumhydrogenphosphat

Anschließend wurde die Möglichkeit der fraktionierten Fällung mit Polyäthylenglykol (durchschnittliches Molekulargewicht 1500 und 6000) bis zu einem Gehalt von 33 % untersucht. Dabei wurde eine geringe, nicht sicher reproduzierbare Anreicherung erhalten.

Als weitere Möglichkeit bot sich die fraktionierte Fällung mit Diammoniumhydrogenphosphat an, wobei die Isomerase zwischen 350 g und 530 g Diammoniumhydrogenphosphat pro Liter im Niederschlag erschien, und die bei der Proteinkonzentration, die nach der Streptomycinsulfatfällung erhalten wurde, besonders günstig verläuft. Gleichzeitig ließ sich dabei für die nachfolgende Gelfiltration an Sephadex G 100 eine genügend konzentrierte Lösung erhalten.

Durch diese Fällung war eine etwa dreifache Anreicherung bei 80 % Ausbeute erreichbar, wenn das vorgekühlte Salz unter guter Kühlung von außen sehr langsam der Lösung zugesetzt wurde.

#### 5. Gelfiltration an Sephadex G 100

Bis zur Fällung der Isomerase mit Diammoniumhydrogenphosphat konnte eine Anreicherung in drei Tagen durchgeführt werden. Für diesen Zeitraum war die Isomerase genügend stabil. Da die weiteren Schritte jedoch wesentlich mehr Zeit benötigten, mußten Möglichkeiten zur Stabilisierung der Proteinlösungen gesucht werden.

Zugaben von Thioglykol oder Dithiothreitol allein erwiesen sich als nicht ausreichend. Eine zusätzliche Konzentration von 3 - 5 % Glycerin war zur Stabilisierung der Isomerase bei den nachfolgenden Anreicherungsverfahren geeignet.

Anfangs wurde versucht, die von Lengsfeld beschriebenen Schritte - Manganchloridfällung, Hitzedenaturierung und Ammoniumsulfatfällung - zu übernehmen und weiter zu verbessern. Die angegebenen Anreicherungsfaktoren waren ohne weiteres erreichbar, jedoch konnte die Ausbeute über diese drei Schritte mit etwa dreifacher Anreicherung nicht über 30 % gesteigert werden.

Aus Ergebnissen der Gradientenzentrifugation wurde von Lengsfeld ein Molekulargewicht zwischen 31 000 und 41 000 für die Isomerase abgeschätzt. Es erschien deshalb zweckmäßig, mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G 100 eine Reinigung der Isomerase auf Grund der Molekülgröße durchzuführen.

(Da die für die ersten Versuche verwendete Hefe aus Oberkotzau, ab Oktober 1971 (S. 63) nicht mehr zur Verfügung stand, mußten nach Möglichkeit Verfahren Anwendung finden, die sich ohne wesentliche Änderung der Bedingungen auch auf andere Hefestämme übertragen lassen.)

Die bei der Gelfiltration verarbeitbare Menge war beschränkt durch die Kapazität der zur Verfügung stehenden Chromatographiesäule, während sich bei allen vorhergehenden Schritten die eingesetzte Menge ohne großen Aufwand erhöhen ließ. Deshalb wurde, wo möglich, auf Kosten einer hohen Ausbeute auf einen günstigeren Anreicherungsfaktor hingearbeitet.

Die Methode, die auf die Säule auftragbare Menge zu vergrößern und die Reinigung durch cyclische Chromatographie (Lit. 26) trotzdem in anwendbaren Grenzen zu halten, konnte nicht untersucht werden, da zum Zeitpunkt der Ausarbeitung der Anreicherung der schnellere fluorimetrische Test noch nicht zur Verfügung stand. Außerdem mußte damit gerechnet werden, daß die Isomerase infolge zu stark abnehmender Konzentration denaturiert würde. Das gleiche Resultat wäre zu erwarten bei Kopp-

lung zweier Säulen.

In Anlehnung an die diskontinuierliche cyclische Chromatographie (Lit. 27), bei der nach fraktioniertem Auffangen des Eluates, Abtrennung unerwünschter Fraktionen, die aktiven Lösungen in der gleichen Reihenfolge zur weiteren Trennung wieder auf die gleiche Säule gegeben werden, wurde folgendes Verfahren ausgearbeitet:

Die aus der Chromatographiesäule kommende Lösung wurde mit Hilfe der Ultrafiltration kontinuierlich konzentriert. Hierzu bot sich der von Amicon entwickelte Säuleneluatkonzentratoren CEC 1 an. Die entstehende Lösung wurde dann auf eine zweite Säule gepumpt, wobei eine weitere Auftrennung ohne Gefahr einer zu starken Verdünnung möglich war.

Durch die Erhöhung der Proteinkonzentration auf etwa den vierfachen Wert sank jedoch die Durchflußgeschwindigkeit der zweiten Säule auf ein Viertel. Deshalb wurde zur weiteren Auftrennung Sephadex G 100 superfine verwendet (Lit. 28).

Zur Vereinfachung wurden die Fraktionen, die, wie aus Vorversuchen ermittelt wurde, keine Isomerase enthalten konnten, zwischen beiden Säulen abgetrennt.

Durch die Gelfiltration ließ sich eine etwa 3 - 4-fache Anreicherung bei bis zu 80 % Ausbeute erreichen. Das Elutionsdiagramm ist in Abb. 18 wiedergegeben.

Im Anschluß an die Gelfiltration ließen sich nur Reinigungsschritte verwenden, die sich bei Proteinkonzentrationen um etwa 2 mg/ml dem aus der Gelfiltration erhaltenen Wert durchführen lassen. Dafür boten sich unter anderem folgende Verfahren an:

Affinitätschromatographie, Fällungsreaktionen, Ionenaustauschchromatographie, isoelektrisches Fokussieren.



Abb. 18 Reinigung der Isomerase durch Gelfiltration an Sephadex G 100

(Säule: 10 cm x 90 cm; aufgetragenes Protein: 3500 mg;

Puffer: 0,02 M Tris/HCl, pH = 7,2; 2 % Glycerin, 5mM Thioglykol, 0, 25 mM  $MgK_2EDTA$

Ausführung s.S. 73)

## 6. Affinitätschromatographie

Diese Methode beruht auf der spezifischen Erkennung der Substrate, Hemmstoffe oder anderer Produkte durch Enzyme. Werden derartige Stoffe an ein geeignetes Trägermaterial (z.B. Cellulose oder Sepharose) gebunden, so kann bei Chromatographie der Proteinlösung an diesem Material das Enzym durch Wechselwirkung mit diesem Stoff verzögert im Eluat erscheinen oder völlig festgehalten werden, um dann, getrennt von Begleitproteinen, durch verschiedene Methoden eluiert zu werden, wobei in einer Stufe große Proteinreinheit bei hoher Ausbeute erreicht werden kann (Lit. 29 - 33).

Zur Affinitätschromatographie wurden unter anderem Amine unterschiedlicher Kettenlänge hergestellt, deren Aufbau dem organischen Rest des Substrates (IPP) oder dessen Umwandlungsproduktes (DMAPP) ähnlich waren, und die dann nach der Bromcyan-Methode (Lit. 34) mit Sepharose verknüpft wurden.

Der genaue Mechanismus der Reaktion von Bromcyan mit Sepharose ist noch nicht bekannt; wahrscheinlich entsteht als reaktive Zwischenstufe ein Imidocarbonat, das mit dem zugesetzten Amin zum N-Alkyl-carbamat, -Imidocarbamat oder -Isoharnstoffderivat reagiert, so daß das Endprodukt diese verschiedenen Gruppen enthalten kann.

Das günstigste Ergebnis wurde erreicht bei Anwendung von 6-Amino-2-methylhepten-(2) (siehe Abb. 19) und 5-Amino-2-methylhexen-(1).

(Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei dieser Trennung teilweise um Ionenaustauscheffekte gehandelt hatte.)

Da jedoch dieses Ergebnis nicht sicher reproduzierbar war und allgemein die Kapazität einer Säule bei der Affinitätschromatographie sehr gering ist, wurde als nächster Schritt die Ionenaustauschchromatographie gewählt.

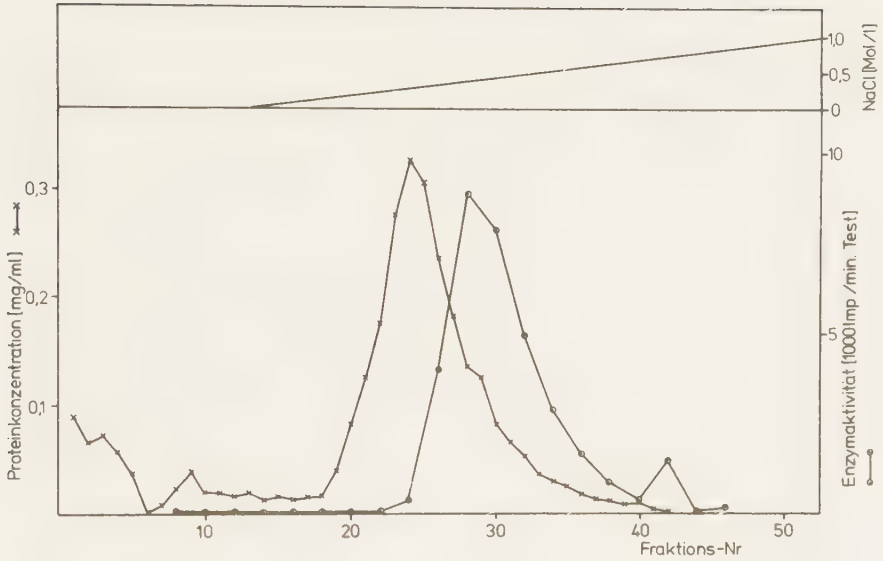


Abb. 19 Affinitätschromatographie der Isomerase an Sepharose 4B - 6-Amino-2-methylhepten-(2) (Säule: 0,9 cm x 14,5 cm; Puffer: 0,02 M Tris/HCl, pH = 7,2, 5 % Glycerin; aufgetragenes Protein 2,5 mg in 5,5 ml Puffer; Elution durch steigenden NaCl-Gradienten)

## 7. Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die Chromatographie an DEAE-Cellulose konnte von Lengsfeld nur nach Änderung in wesentlichen Punkten übernommen werden:

Bei der Verwendung von Phosphatpuffer wurde häufig Desaktivierung beobachtet, die wahrscheinlich durch lokale pH-Änderungen verursacht wurde, die (nach Lit. 35,36) bei Verwendung von anionischen mehrwertigen Puffern, besonders bei Phosphatpuffern, an Anionenaustauschern zu beobachten sind. Läßt man jedoch die Pufferwirkung vom Kation statt vom Anion ausgehen, so läßt sich eine Desaktivierung vermeiden. Es wurde deshalb Tris-HCl-Puffer verwendet, der zur Enzymstabilisierung etwa 5 % Glycerin enthielt und der, um einen Pufferwechsel zu vermeiden, auch bei der Sephadex-Gelfiltration verwendet wurde.

Die aktiven Fraktionen aus dem Eluat der Gelfiltration wurden ohne Änderung direkt auf eine DEAE-Cellulose-Säule gepumpt, da Proteine auch aus sehr verdünnten Lösungen an Ionenaustauscher adsorbiert werden.

Die Elution erfolgte durch einen steigenden Natriumchloridgradienten.

Wurden größere Proteinmengen verarbeitet, so wurde die Länge der Säule (etwa 20 cm) beibehalten und nur der Säulendurchmesser vergrößert, um nicht die Trennwirkung wieder teilweise aufzuheben (Lit. 73).

Die Isomerase ließ sich 7 bis 8-fach bei etwa 50 % Ausbeute anreichern. Eine Desaktivierung wurde nicht mehr beobachtet. Ein typisches Elutionsdiagramm zeigt Abb. 20

Die für die Proteinkonzentration angegebene Kurve, die aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm errechnet wurde, ist wahrscheinlich nicht völlig korrekt, da das zur Stabilisierung zugesetzte Mg-EDTA ebenfalls an DEAE-Cellulose adsorbiert und in höherer Konzentration bei einer bestimmten Molarität an Natriumchlorid eluiert wird und dann die Proteinbestimmung stört (Lit. 37).

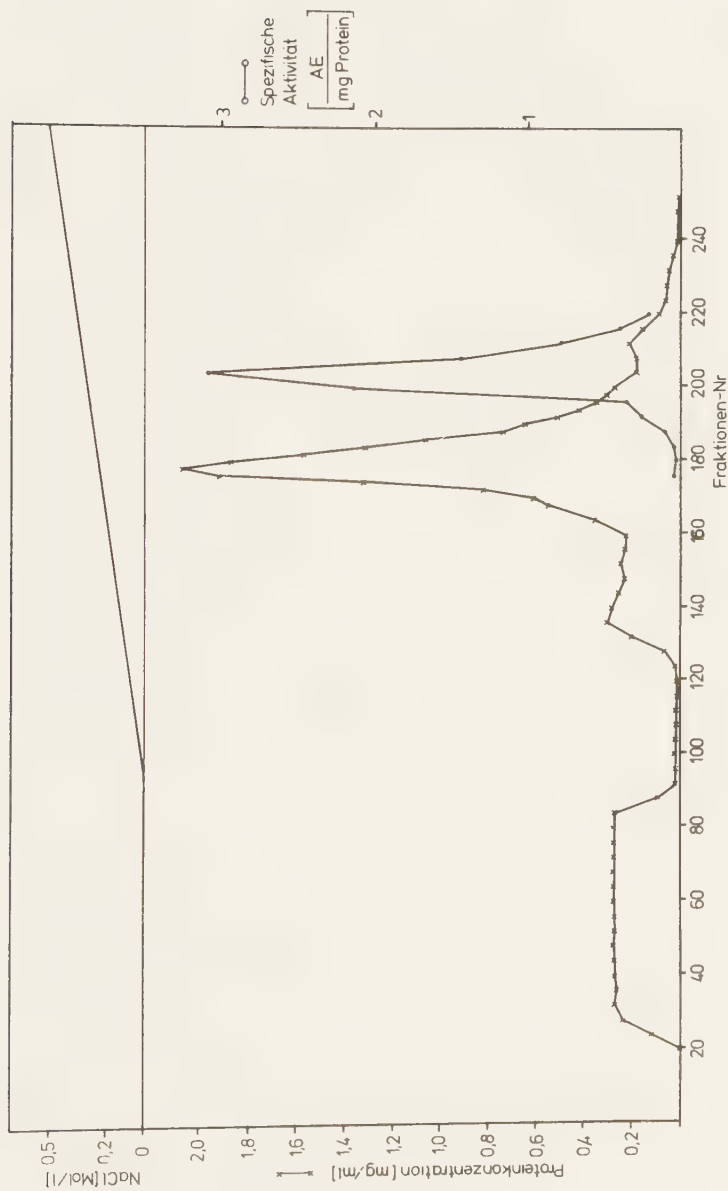


Abb. 20 Reinigung der IIP-Isomerase

Chromatographie an DEAE-Cellulose (Säule: 5 cm x 21 cm; Puffer: 0,02 M Tris/HCl  
pH = 7,2; 5 % Glycerin; Auftrag: 820mg Protein; Ausführung s.S. 74)

## 8. Isoelektrische Fokussierung in Sephadex

Als nächster Reinigungsschritt waren Trennungen auf Grund der Ladungen, also Elektrophorese und isoelektrische Fokussierung geeignet.

Die Elektrophorese lieferte mit Sephadex G 100 als Trägermaterial in einer Säulenapparatur ähnlich der von G. Bundschuh (Lit. 38) beschriebenen, etwa vierfache Anreicherung.

Da die Ausgangsproteinlösungen sehr verdünnt waren, es jedoch an geeigneten Möglichkeiten fehlte, eine für die Elektrophorese ausreichende Konzentrierung zu erzielen, wurde die isoelektrische Fokussierung gewählt, die auch mit sehr verdünnten Lösungen durchführbar ist. Zuvor wurde jedoch, soweit möglich, die Proteinkonzentration erhöht,

a) mit Hilfe der Ultrafiltration in Amicon-Diaflo-Zellen.

Durch Überdruck wird die Lösung durch ein feinporiges Filter gepreßt, wobei bei geeigneter Auswahl Moleküle, wie Proteine, über einer bestimmten Größe zurückgehalten werden.

Damit ließ sich an dieser Stelle eine etwa zehnfache Konzentrierung erreichen; über diesem Wert wurde die Isomerase mehr und mehr desaktiviert. Bei Verwendung des Amicon-PM-10-Filters wurde keine Aktivität im Filtrat beobachtet. Da Glycerin die Ultrafiltration behindert, war dessen vorherige Entfernung durch Dialyse oder Gelfiltration nötig.

b) durch Adsorption an DEAE-Cellulose und anschließender Desorption.

Wie schon bei der Ionenaustauschchromatographie konnte eine Desaktivierung bei dieser Methode durch geeignete Pufferwahl vermieden werden. Durch dieses Verfahren wurde eine etwa zehnfache Konzentrierung auf 1 - 2 mg/ml erreicht.

Zur Adsorption mußte entweder Natriumchlorid durch Dialyse oder Ultrafiltration entfernt oder die Lösung verdünnt werden.

Die konzentrierte Lösung wurde der Elektrofokussierung unterworfen. Da der isoelektrische Punkt der Isomerase bei  $\text{pH} = 4,4$  liegt, wurde eine Ampholine-Lösung für den Bereich  $\text{pH} = 3 - 6$  ausgewählt.

Viele Proteine werden in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes denaturiert, so daß bei einer Säulenelektrofokussierung mit einem Zuckergradienten bereits gereinigtes Protein durch Niederschläge wieder verunreinigt werden kann. Diese Gefahr besteht nicht bei Ausführung auf Dünnschichtplatten mit Sephadex als Träger (verwendet wurden G 100 und G 75) (Lit. 39 - 42), da ausgefallenes Protein nicht weiter wandert. Zusätzlich kann der pH-Gradient erstellt werden, bevor das Protein zugesetzt wird. Damit wird die Zeit, in der die Isomerase der Elektrofokussierung ausgesetzt ist, reduziert.

Zur Stabilisierung wurde etwa 5 % Glycerin zugesetzt. Als Elektroden dienten die im experimentellen Teil beschriebenen Konstruktionen. Die Lokalisierung erfolgte auf Grund der Messung des pH-Wertes in der Sephadex-Schicht mit einer Flachmembran-pH-Elektrode oder nach dem Abklatsch-Verfahren mit Filterpapier und anschließendem Anfärben. Die Elution erfolgte durch Auskratzen des entsprechenden pH-Bezirks und anschließende Elution mit Puffer in kleinen Säulen. (Günstiger dürfte die Apparatur von E.Valmet (Lit. 43) sein, die jedoch nicht zur Verfügung stand.)

Etwa 5-fache Anreicherung bei 20 % Ausbeute wurde durch die isoelektrische Fokussierung erzielt. Vermutlich wurde ein Teil des Enzyms auch bei dem verwendeten Dünnschichtverfahren inaktiviert, so daß eine weitere Überarbeitung dieses Reinigungsschrittes unerlässlich ist.

Das aus dem Gel eluierte Protein, dessen Menge infolge der geringen Konzentration nicht genau bestimmt werden konnte, zeigte sowohl bei der Diskelektrophorese (s.S.79) als auch bei der SDS-Diskelektrophorese in Polyacrylamidgel (s.S.80) nur eine Bande, so daß die erhaltene Isomerase nur noch geringe Mengen an Fremdproteinen enthalten konnte.

Tabelle 2 ( Seite 36 ) gibt einen Überblick über die durchgeführten Reinigungsschritte für die IPP-Isomerase.

Tabelle 2

Übersicht über die Anreicherung der IPP-Isomerase

(Die Angaben sind Durchschnittswerte aus mehreren Anreicherungen; Ausgangsmaterial jeweils ca. 15 kg Hefe; 1 AE ist diejenige Proteinmenge, die in 1 min 1  $\mu$ Mol C-14-IPP umsetzt)

| Anreicherungs-schritt                            | Protein<br>mg | Gesamtaktivität<br>AE | Spezifische Aktivität<br>AE/mg | Ausbeute<br>% |
|--------------------------------------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|---------------|
| Aufschluß, Dialyse                               | 110 000       | 1600                  | 0,015                          | 100           |
| Gelschritt, Dialyse<br>Streptomycinsulfatfällung | 20 000        | 800 - 900             | 0,04                           | 50 - 55       |
| Ammoniumphosphatfällung                          | 6 500         | 650                   | 0,1                            | 40            |
| Sephadex G 100<br>Gelfiltration                  | 1 700         | 500 - 550             | 0,3                            | 30            |
| DEAE-Cellulose-<br>Chromatographie               | 105           | 250                   | 2,4                            | 15            |
| isoelektrische<br>Fokussierung                   | (0,06)        | (0,7)                 | 12                             | 3             |

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden jeweils nur 1,5 mg des vorgereinigten Enzyms eingesetzt.

### III) Eigenschaften der IPP-Isomerase

#### 1. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Zur Einführung des letzten Reinigungsschrittes für die Isomerase war die Kenntnis ihres isoelektrischen Punktes (IEP) Voraussetzung.

Eine einfache und genaue Methode zu seiner Ermittlung wurde durch die isoelektrische Fokussierung eingeführt (Lit. 44).

In einem gegen Konvektionsströmung stabilisiertem Medium legt man an eine Lösung von Trägerampholyten (einem Gemisch aus Polyaminopolycarbonsäuren mit niedrigem Molekulargewicht) eine Gleichspannung an. Proteine und Aminocarbonsäuren wandern entsprechend ihrer Ladungen zu den Elektroden, wobei durch Protonenaustausch ein pH-Gradient entsteht, und werden dabei an ihren isoelektrischen Punkten fixiert.

Als Stabilisierungsmedium wurde für die Anreicherung Sephadex, für die Ermittlung des IEP ein Dichtegradient von Saccharose in der serienmäßigen LKB-Säule 8101 verwendet.

In Abb. 21 ist das Ergebnis einer Säulenelektrofokussierung der Isomerase im pH-Bereich 3 - 6 dargestellt. Der IEP liegt demnach bei einem pH-Wert von 4,4.

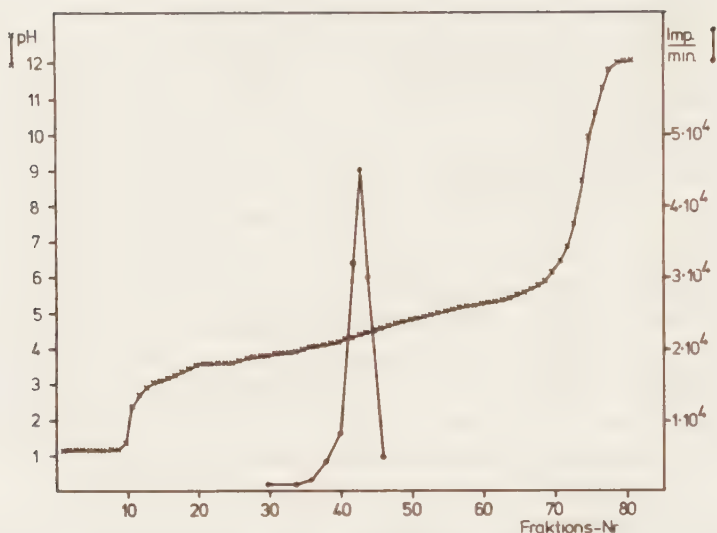


Abb. 21 pH-Gradient und Aktivitätsverteilung bei der isoelektrischen Fokussierung der IPP-Isomerase in der LKB-Säule 8101 im Bereich pH = 3 - 6 (Ausführung S.82)

## 2. Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Diskelektrophorese

Werden Proteine in 1 %iger Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) inkubiert, so erfolgt Entfaltung der Ketten durch Störung der Nebenvalenzen und Beladung der Proteine mit SDS. Die dabei entstehenden Komplexe haben die ursprüngliche Ladung der Proteine verloren und wandern, verursacht durch die negative Ladung der SDS-Moleküle, im elektrischen Feld zur Anode. Weber, Osborn und andere Autoren (Lit. 45 - 48) weiteten diese Elektrophoreseart zu einer Methode der Molekulargewichtsbestimmung aus, wobei durch unterschiedlichen Vernetzungsgrad des als Träger verwendeten Polyacrylamidgels Wanderungsgeschwindigkeit und -strecke variierbar sind.

Trägt man den Logarithmus der Molekulargewichte der Proteine gegen die relative Mobilität  $y$  auf, so läßt sich bei gleicher Gelzusammensetzung nach Eichung mit Bezugsproteinen (Tab. 3) das Molekulargewicht ablesen (Abb. 22)

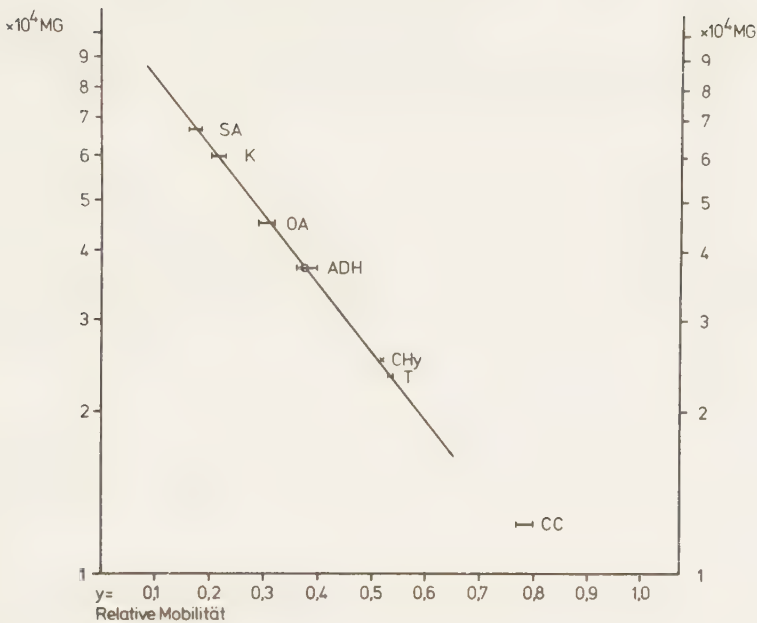


Abb. 22 Bestimmung des Molekulargewichts der IPP-Isomerase durch SDS-Diskelektrophorese (Molekulargewichte und Abkürzungen siehe Tabelle 3; Ausführung s.S.80 )

Tabelle 3 Bezugsproteine zur SDS-Diskelektrophorese

|     | Protein               | Molekulargewicht |
|-----|-----------------------|------------------|
| SA  | Serumalbumin          | 67 000           |
| K   | Katalase-Untereinheit | 60 000           |
| OA  | Ovalbumin             | 45 000           |
| ADH | Alkoholdehydrogenase  | 37 000           |
| CHy | Chymotrypsinogen      | 25 000           |
| T   | Trypsin               | 23 300           |
| CC  | Cytochrom C           | 12 400           |

Serumalbumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen und Cytochrom C wurden auch für die Molekulargewichtsbestimmung nach der Sephadex-Methode verwendet.

Für die Isomerase wurde die gleiche relative Mobilität  $y$  wie für die Alkoholdehydrogenase gefunden, so daß sich aus Abb. 22 in guter Übereinstimmung mit dem Wert aus der Gelfiltration ein Molekulargewicht von etwa 37 000 ergibt.

### 3. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Diese Methode ist auf Seite 60 bei der Prenyltransferase beschrieben. Für die Isomerase ergab sich bei Verwendung der oben angeführten Eichproteine ein Molekulargewicht zwischen 39 000 und 41 000.

### 4. Hemmversuche

Aus Beladungsversuchen mit Jodacetamid in An- und Abwesenheit des Substrates IPP wurde von Lengsfeld die Beteiligung zweier Gruppen im aktiven Zentrum der Isomerase gefolgert, die beide mit Jodacetamid reagieren und die mit  $S_x$  und  $S_y$  bezeichnet wurden.

Von Cornforth wurden aus dem sterischen Ablauf der Isomerisierung ebenfalls zwei Gruppen gefordert, die sich zur Protonabgabe, bzw. -aufnahme in einer Proteinfalte gegenüberstehen sollten.

Da jedoch Jodacetamid nicht nur mit SH-, sondern auch mit Imidazol-Gruppen reagiert, könnte neben einem Cystein- auch ein Histidinrest an der Umwandlung von IPP zu DMAPP beteiligt sein.

Die Photooxidation in Gegenwart von Sensibilisatoren wie Bengal-Rosa ergibt eine rasche Zerstörung von Histidin, kann jedoch auch zu langsamer Oxidation des in der Isomerase vorhandenen Cysteins führen, so daß eine dadurch herbeigeführte Inaktivierung nur wenig Aussagekraft über die Beteiligung von Histidin hätte (Lit. 50)

#### a) Hemmung mit Diäthylpyrocarbonat

Diäthylpyrocarbonat wurde von Mühlrad (Lit. 51) für die spezifische Modifizierung von Histidin vorgeschlagen.

Das Reagens ist außerdem empfindlich gegen nukleophilen Angriff durch Tyrosin, Cystein, Lysin und Tryptophan (Lit. 52). Zum Beispiel werden freie Aminogruppen bei neutralem bis schwach alkalischem pH in die N-Carbäthoxyderivate nach folgender Gleichung überführt:



wobei der Überschuß an Diäthylpyrocarbonat langsam zu Äthanol und  $\text{CO}_2$  zerfällt.

Wie jedoch von Mühlrad gezeigt werden konnte, findet die Carb-äthoxylierung bei  $\text{pH} = 6$  bevorzugt an Histidinresten statt (Lit. 53).

Isomerase-Lösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen Diäthylpyrocarbonat versetzt. Dabei zeigte sich eine Reduzierung der Aktivität oberhalb einer Konzentration des Hemmstoffes von 0,1 mM (siehe Abb. 23), so daß wahrscheinlich Histidinresten eine wichtige Rolle für die enzymatische Aktivität zugeschrieben werden kann.

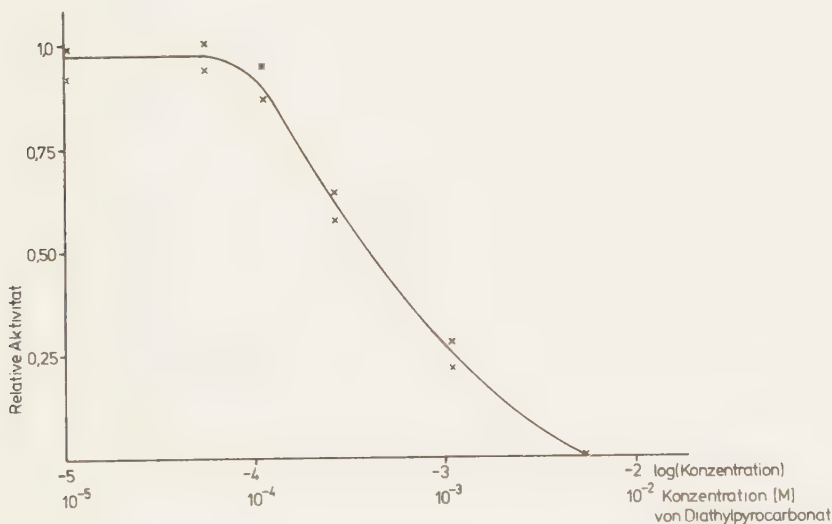
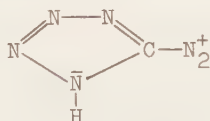


Abb. 23 Hemmung der IPP-Isomerase mit Diäthylpyrocarbonat  
(Relative Aktivität nach Inkubation mit Diäthylpyrocarbonat in Kaliumphosphatpuffer,  $\text{pH} = 6,0$ , bei  $0^\circ\text{C}$ ; Isomerasekonzentration:  $90 \mu\text{g/ml}$   
Ausführung s.S.75 )

b) Hemmung mit 5-Diazo-1-H-tetrazol

Als weiteres Reagens auf Histidin ( und auf Tyrosin ) wurde von H.Horinishi et al. ( Lit. 54 - 56 ) 5-Diazo-1-H-tetrazol beschrieben:



5-Diazo-1-H-tetrazol

Mit beiden Aminosäuren kann es zu Monoazo- und Diazoprodukten kuppeln.

Den Einfluß des Reagens auf die Reaktion der Isomerase zeigt Tabelle 4:

Tabelle 4

| Konzentration von<br>5-Diazo-1-H-tetrazol<br>( $\mu\text{M}$ ) | Imp./min<br>je Test | % Hemmung |
|----------------------------------------------------------------|---------------------|-----------|
| 0                                                              | 4892                | 0         |
| 10                                                             | 3013                | 38        |
| 20                                                             | 2501                | 49        |
| 50                                                             | 331                 | 92        |
| 100                                                            | 0                   | 100       |

( 150  $\mu\text{g}$  Isomerase in 3,0 ml 0,5 M Bicarbonatpuffer pH 8,6 bei 20 Grad mit 0,4 ml Diazotetrazollösung 20 Min. inkubiert, nach Zusatz von 0,2 ml 0,2 M Tris-Acetat-Puffer pH 7,5 Test mit aliquoten Teilen )

Bereits mit einer Diazotetrazol-Konzentration von  $10^{-5}$  M konnte eine Verminderung der enzymatischen Aktivität erreicht werden.

c) Hemmung mit N-(N'-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleinimid (ASPM)

Für die Reaktion der Isomerase ist die Mitwirkung zweier Gruppen zu fordern, von denen eine als Cystein identifiziert wurde und deren andere wahrscheinlich Histidin ist. Aus räumlichen Gründen sollte das aktive Zentrum des Enzyms in einer Proteinfalte liegen, um die beiden Reste in die nötige Stellung zueinander zu bringen.



Bei einer Konzentration von etwa 1 mM ergibt sich für NEM eine deutlich stärkere Hemmung als mit ASPM. Nimmt man vereinfachend an, daß dieser Unterschied nur auf sterische Hinderung zurückzuführen ist, so kann dieser Versuch als Hinweis auf die verdeckte Lage der SH-Gruppe und damit des aktiven Zentrums verwendet werden.

Eine ähnliche Wirkung wurde mit N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)-maleinimid (Lit. 59) erzielt, das jedoch durch seine geringere Löslichkeit in wäßrigen Systemen keine eindeutigen Resultate ergab.

#### d) Inhibierung durch Puffersubstanzen

Die Reaktion der Isomerase wird durch Phosphat, Imidazol und Citrat gehemmt, so daß die Verwendung dieser Substanzen als Puffer vermieden wurde.

#### IV. Zusammenfassung und Diskussion

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, zunächst neue Möglichkeiten zur Messung der Isomerase-Aktivität zu entwickeln.

Dieses Ziel konnte erreicht werden:

Neben der Methode, die sich aus dem Biosyntheseweg des Cholesterins ergibt, nämlich der Kondensation von DMAPP mit IPP durch die Prenyltransferase und Messung des dabei entstandenen Farnesyl-PP (radioaktiver Test II, s.S. 9 ff) wurden fluorimetrische Tests zur Bestimmung der Aktivität gefunden.

Für die angeführten Methoden ergeben sich folgende Anwendungsbereiche:

##### a) Radioaktiver Test I

(Messung des nicht umgesetzten IPP)

Diese Methode ist aus den auf Seite 9 angeführten Gründen ungenau und durch die lange Aufarbeitung der Testmischung umständlich. Die zusätzlich nach Lit. 16 auf Seite 9 angeführte Bestimmung des aus DMAPP mit Säuren erhaltenen Hydrolyseproduktes ist einfacher durchzuführen, da die Zugabe von IPP nicht mit der gleichen Präzision erfolgen muß, kann jedoch durch Bildung flüchtiger Hydrolyseprodukte zu Meßfehlern führen; sie eignet sich deshalb bevorzugt zur Vermessung von Säuleneluat, bei denen es vor allem auf Lokalisierung, weniger aber auf quantitative Bestimmung des Enzyms ankommt.

##### b) Radioaktiver Test II

(Messung des mit Hilfe der Prenyltransferase gebildeten Farnesyl-PP)

Durch die Umwandlung jedes gebildeten DMAPP in FPP wird eine hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit erreicht. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, daß für diesen Test die Prenyltransferase, die zusätzlich angereichert werden muß (Teil V), benötigt wird.

c) Fluorimetrischer Test I

(Bestimmung des Pyrophosphats nach Hydrolyse von entstandenem DMAPP, s.S. 18)

Gegenüber den radioaktiven Tests bringt diese Methode keine wesentliche Verbesserung in der Schnelligkeit der Durchführung, da die Aufarbeitung ähnlich umständlich ist. Vorteilhaft wirkt sich jedoch die Unabhängigkeit der Isomerase-Reaktionen von den Folgereaktionen bei der Untersuchung vieler Einflüsse, z.B. pH-Wert oder Temperatur, auf die Isomerase aus.

d) Fluorimetrischer Test II

(Bestimmung des Pyrophosphates, das bei der Kondensation von DMAPP und IPP zu FPP entsteht, s.S. 19)

Dabei handelt es sich eindeutig um den schnellsten Test, der jedoch nur sehr begrenzt anwendbar ist. Besondere Vorteile kann er für Reihenbestimmungen, bei denen es nicht auf große Genauigkeit ankommt, bringen. Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß die Kopplung so vieler Prozesse Ungenauigkeiten durch Diffusion der Substrate von Enzym zu Enzym bringen muß. Die angeführten fluorimetrischen Tests sind jedoch, wie bereits im allgemeinen Teil angedeutet, erweiterungsfähig und auch zur Bestimmung der Prenyltransferase geeignet.

Da nach Lit. 13 bereits eine Anreicherung der IPP-Isomerase bekannt gewesen war, erhebt sich die Frage, ob es sinnvoll war, einen neuen Reinigungsweg auszuarbeiten. Lengsfeld ging von großen Mengen Hefe aus, deren Verarbeitung erhebliche Zeit benötigte, wobei ungünstige Auswirkungen auf Aktivität und Ausbeute festzustellen waren. Es gelang in dem angeführten Reinigungsweg, besonders durch Einführung der Gelfiltration die Ausgangsmenge durch Ausbeuteverbesserung bei einzelnen Schritten zu reduzieren. Gleichzeitig konnte die Desaktivierung bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose vermieden werden, so daß größere Mengen Enzym ohne Schwierigkeiten isoliert werden können.

Mit der angereicherten Isomerase wurden folgende Hemmversuche durchgeführt:

Hemmung mit Diäthylpyrocarbonat (s.S. 40) und 5-Diazo-1-H-tetrazol (s.S. 42) und Vergleich der Hemmung mit NEM und ASPM (s.S. 42).

Nach Mühlrad (Lit. 51) findet die Reaktion mit Diäthylpyrocarbonat bei dem angewandten pH = 6 bevorzugt an Histidinresten statt. Andererseits reagiert Jodacetamid, dessen Reaktion mit der Isomerase zu deren Entdeckung geführt hatte, nicht spezifisch mit Thiolgruppen, sondern auch mit anderen nucleophilen Resten, wie z.B. mit dem Stickstoff im Imidazolring eines Histidinrestes, so daß die Annahme, daß an der katalytischen Reaktion ein Histidin-Rest beteiligt ist, nicht den Anlagerungs- und Hemmversuchen mit C-14-Jodacetamid von Lengsfeld widerspricht. Eine weitere Bestätigung kann in der, wenn auch unspezifischeren, Reaktion der Isomerase mit 5-Diazo-1-H-tetrazol gesehen werden.

N-Alkyl-maleinimide reagieren bevorzugt mit SH-Gruppen. Bei Alkoholdehydrogenase aus Hefe konnte gezeigt werden, daß die Hemmung mit steigender Kettenlänge des Alkylrestes zunimmt (Lit. 50). Ersetzt man deshalb am Stickstoff des verwendeten Maleinimids den Äthylrest durch die N'-Acetylsulfamoylphenyl-Gruppe, so sollte sich eine stärkere Hemmung ergeben (wenn sich obiges Ergebnis auf diesen Rest übertragen läßt, was nicht bewiesen ist!).

Andererseits sollte jedoch die Reaktion von ASPM mit SH-Gruppen, die in einer engen Proteinfalte an der katalytischen Reaktion beteiligt sind, durch den großen N'-Acetyl-4-sulfamoyl-phenyl-Rest am Stickstoff behindert sein. Da für ASPM im Gegensatz zu dem wesentlich kleineren NEM keine Hemmung im untersuchten Bereich gefunden wurde, kann angenommen werden, daß durch sterische Hinderung die Reaktion des Hemmstoffes mit der SH-Gruppe unterbunden wurde, das aktive Zentrum der Isomerase also tatsächlich in einer engen Proteinfalte liegt.

Von Cornforth wurde für das aus Schweineleber isolierte Enzym durch Isotopenversuche nachgewiesen, daß die Abspaltung und Anlagerung von Protonen bei der Isomerisierungsreaktion nicht von der gleichen Seite erfolgen kann (siehe Einleitung).

Nimmt man an, daß diese Tatsache auch auf das aus Hefe im beschriebenen Anreicherungsang isolierte Enzym zutrifft, so läßt sich daraus unter Berücksichtigung der oben angeführten Versuche zur Hemmung das in Abb. 25 ( Seite 49 ) dargestellte Reaktionsschema ableiten:

Isopentenyl-PP wird in die Proteinfalte des aktiven Zentrums der Isomerase eingelagert. Histidin und Cystein wirken nun von entgegengesetzten Seiten als Protonüberträger; dabei gibt z.B. die SH-Gruppe des Cysteins ein Proton an das C-Atom 4 des Isopentenyl-PP ab, während der Imidazol-Ring des Histidins vom C-Atom 2 ein Proton aufnimmt. Die Elektronen werden entsprechend verschoben, wie es durch Pfeile angedeutet ist. Dabei kann jedoch noch nicht angegeben werden, welche der beiden Gruppen als Protondonator oder -akzeptor bei der Umwandlung von Isopentenyl-PP zu Dimethylallyl-PP dient, so daß Abb. 25 nur eine Möglichkeit zeigt.

Weitere Untersuchungen, z.B. Reaktion mit dem bifunktionellen Reagenz 1,3-Dibromaceton ( Lit.50 ) zur Umsetzung mit beiden im aktiven Zentrum anzunehmenden Gruppen und anschließender Hydrolyse und Identifizierung, sind jedoch noch durchzuführen, da die Hemmung mit Histidinreagenzien nicht beweist, daß sich das nachgewiesene Histidin an der katalytischen Reaktion beteiligt.

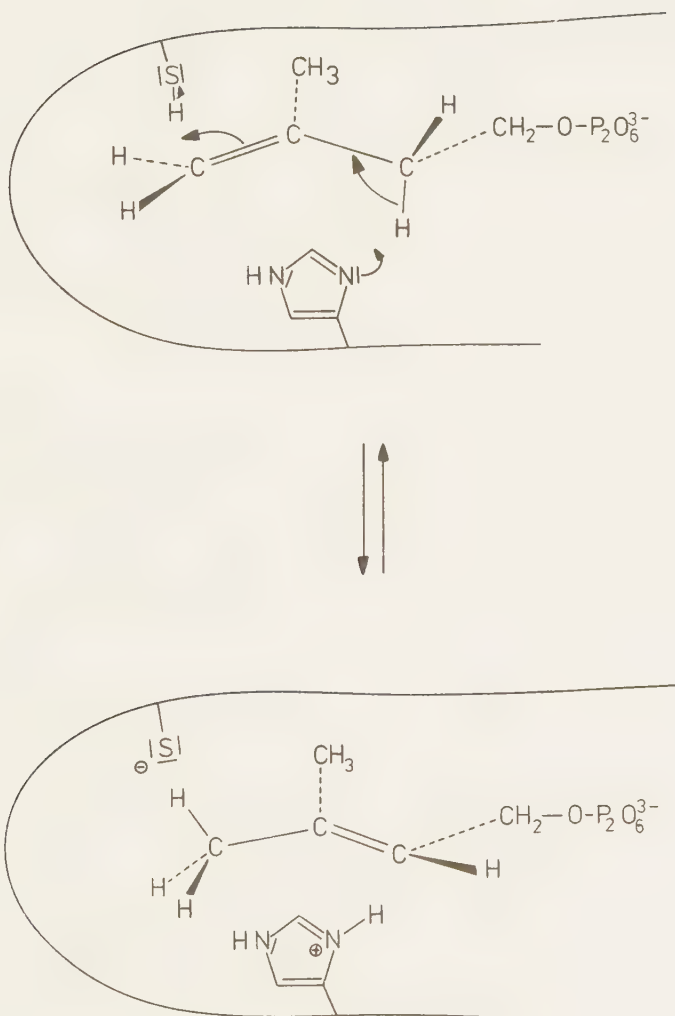


Abb. 25 Vorschlag zum Ablauf der Isomerisierungsreaktion

## V. Reinigung der Prenyltransferase

Lynen und Agranoff (Lit. 23) reicherten nach Autolyse der Hefe mit Toluol die Prenyltransferase 15-fach an. Durch Variierung und Ergänzung der dabei angewandten Verfahren wurde versucht, die Anreicherung zu erweitern.

### 1. Aufschluß der Hefe

Wie bereits von K.Kirschner (Lit. 19) angegeben, ließen sich höhere Ausbeuten an Protein und Aktivität erzielen nach dreiwöchiger Lagerung der Hefe im Kühlraum bei 4°C.

Als Zellaufschlußverfahren boten sich folgende Möglichkeiten an, die je nach Verfügbarkeit der Geräte genutzt wurden:

#### a) Aufschluß mit Toluol

Durch Änderung der Autolysedauer ließ sich zwar die Proteinausbeute steigern, gleichzeitig sank jedoch die spezifische Aktivität; die Gesamtaktivität sank nach anfänglichem Steigen allmählich wieder ab: das Enzym wird also bei längerer Aufschlußdauer merkbar desaktiviert (Abb. 26)

Am günstigsten erwies es sich, den Aufschluß bei pH = 7,0 auszuführen, da oberhalb pH = 7,5 eine Desaktivierung eintrat.

Die Ergebnisse unterlagen jedoch starken Schwankungen je nach Beschaffenheit der Hefe.

b) Aufschluß durch hochtouriges Schütteln der Hefe mit Glasperlen im Zellhomogenisator nach Merckenschlager et al. (Lit. 60) nach Suspendierung in Puffer

#### c) Im Manton-Gaulin-Hochdruck-Homogenisator

Dabei wurde in Puffer suspendierte Hefe in einer Presse zunächst auf einen Druck von etwa 550 kg/cm<sup>2</sup> komprimiert und wieder expandiert, wobei jedoch ein zweimaliger Durchlauf unter guter Kühlung durch das Gerät für einen vollständigen Aufschluß nötig war.

Bei den beiden letzten Verfahren wurden sehr konstante Ergebnisse erzielt, jedoch lieferten sie nur Lösungen geringerer Proteinkonzentration als bei der Autolyse mit Toluol.

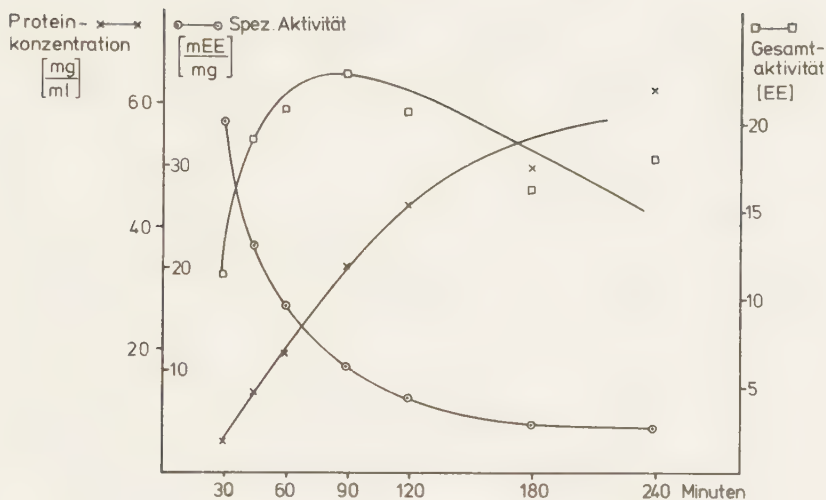


Abb. 26 Anreicherung der Prenyltransferase  
Abhängigkeit der Proteinkonzentration, der spezifischen Aktivität und der Gesamtaktivität von der Dauer der Autolyse mit Toluol (pH = 7,0)

Für kleinere Ansätze erschien Verfahren b, für größere Mengen Aufschluß c zweckmäßiger.

## 2. Erste Fällung mit Ammoniumsulfat

Der Rohextrakt wurde fraktioniert mit Ammoniumsulfat versetzt. Dabei erwies es sich als sinnvoll, zunächst bis zu 40 %iger Sättigung Ammoniumsulfat zuzusetzen. Mit dem entstandenen Niederschlag ließen sich alle beim ersten Zentrifugieren nicht sedimentierten, suspendierten Zellteile entfernen. Die Transferase erschien in der Fraktion zwischen 55 und 75 % Sättigung.

## 3. Reinigung mit Aluminiumoxid-Gel

Nach Dialyse über Nacht wurde eine Reinigung mit Aluminiumoxid-Gel durchgeführt. Das Hauptziel der Anreicherung, die Entfernung von Isomerase-Aktivität, ließ sich damit größtenteils erreichen. Die Isomerase wird bei niedriger Pufferkonzentration an das Gel angelagert, während keine Adsorption der Transferase

beobachtet wird. Bei einem Gel-Protein-Verhältnis von 1 zu 2 und einer Konzentration von 8 mg Protein pro Milliliter Endvolumen wurden die günstigsten Ergebnisse erzielt.

Gleichzeitig wurde bei diesem Schritt ein großer Teil der Nukleinsäuren abgetrennt: der  $\beta$ -Wert stieg von etwa 0,9 auf 1,2.

#### 4. Zweite Ammoniumsulfat-Fällung

Bei dem vorausgegangenen Reinigungsschritt wurden Proteinkonzentrationen von etwa 2 - 4 mg pro Milliliter erhalten. Um die Lösungen zu konzentrieren wurde eine zweite Fällung mit Ammoniumsulfat durchgeführt. Damit ließ sich eine weitere Reinigung erzielen, wenn die Lösung während der Zugabe des Salzes konstant auf pH = 8,0 durch Zutropfen von Ammoniak gehalten wurde. Gleichzeitig wurden die Grenzen der Fraktionierung enger gewählt, um auch auf diese Weise die Reinigungswirkung zu verbessern.

Andere Versuche, wie z.B. Fällung mit Polyäthylenglykol, führten nicht zum Ziel, da erst bei sehr hoher Konzentration eine Fällung eintrat, die sich infolge der hohen Viskosität der Lösung nur sehr schwer abzentrifugieren ließ. Die Aktivität der Transferase wurde dabei nicht beeinflusst.

Ebenfalls keine verwertbaren Ergebnisse wurden erhalten bei Fällung mit Alkohol, Aceton oder 2-Methylpentandiol-(2,4) und bei Hitzedenaturierung.

#### 5. Gelfiltration an Sephadex G 200

Der Niederschlag der Ammoniumsulfat-Fällung wurde möglichst konzentriert in 0,02 M Imidazol/HCl-Puffer aufgenommen. Die weitere Trennung der Proteine erfolgte auf Grund der Molekülgröße durch Chromatographie an Sephadex G 200. (Sephadex G 100 erwies sich als weniger geeignet, obwohl damit beim Molekulargewicht der Transferase eine Reinigung erreicht werden müßte.) Da das Molekulargewicht der Transferase bei 70 000 liegt, das der Isomerase bei 40 000, wurde damit gleichzeitig eine endgültige Trennung der beiden Enzyme erzielt. Das Elutionsdiagramm ist in Abb. 27 wiedergegeben.

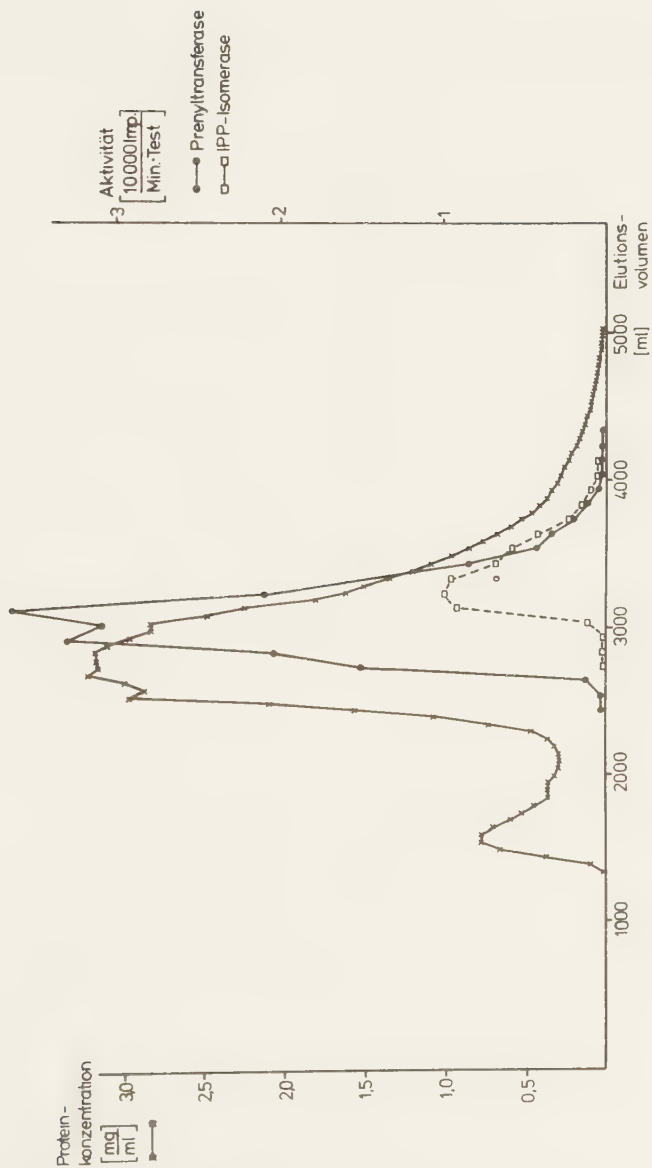


Abb. 27 Gelfiltration der Transferase an Sephadex G 200  
(Säule: 8 cm x 110 cm; Puffer: 0,02 M Imidazol/HCl (pH = 7,0), 0,5 mM Thioglykol,  
0,5 mM  $\text{MgK}_2\text{EDTA}$ ; Protein: 2800mg; Ausführung s.S.77 )

Die Transferase wurde etwa 3-fach angereichert bei einer Ausbeute von bis zu 80 %. Die ersten Transferase-haltigen Fraktionen waren völlig frei von Isomerase und wurden nach weiterer Reinigung für die Hauptversuche verwendet. Die isomerasehaltigen Fraktionen wurden bevorzugt für Vorversuche verwendet. Dazu wurde durch Inkubation der Proteinklösung mit Jodacetamid die Isomerase gehemmt, anschließend die Lösung zur Entfernung des Jodacetamid-Überschusses über Sephadex-G-25-Säulen filtriert oder längere Zeit dialysiert.

#### 6. DEAE-Cellulose-Chromatographie

Wurde das Protein aus der bei der Gelfiltration an Sephadex erhaltenen Lösung an DEAE-Cellulose adsorbiert, so zeigte sich bei Verwendung von Phosphatpuffer in der bei Agranoff (Lit. 23) angegebenen Konzentration nur teilweise, nicht reproduzierbare Adsorption der Transferase. Wurde jedoch die Pufferwirkung durch den kationischen Teil (Imidazol) ausgeübt, so wurde völlige Adsorption beobachtet (Lit. 61). Um einen Pufferwechsel zu umgehen, wurde deshalb der gleiche Puffer bei der Gelfiltration an Sephadex verwendet.

Bei der Elution mit Hilfe eines Natriumchlorid-Gradientens zeigte sich jedoch, daß die Transferase im Hauptgipfel des Proteins erschien. Durch pH-Änderung konnte eine Verschiebung erreicht werden, so daß bei pH = 6,2 die Transferase vor dem Hauptgipfel eluiert wurde (Abb. 28).

Dabei wurde das Enzym bei pH = 7,0 adsorbiert, die DEAE-Cellulose mit Imidazol-HCl-Puffer pH = 7,0, dann pH = 6,2 gewaschen, dann ein Natriumchloridgradient bei pH = 6,2 bis zu einer Konzentration von 0,4 M aufgesetzt. Dabei konnte eine 5-fache Anreicherung bei 70 bis 80 % Ausbeute erreicht werden.

Da die damit erhaltene Transferase völlig frei von Isomeraseaktivität war, wurde keine weitere Reinigung mehr durchgeführt.

Mit der trägerfreien Elektrophorese nach Hannig oder Diskelektrophorese in Polyacrylamidgel (s. experimenteller Teil) wurde nur eine sehr geringe Abtrennung von Begleitproteinen erzielt, da die Transferase unter verschiedenen Bedingungen mit dem Hauptteil des Proteins wandert, während sich aus der gu-

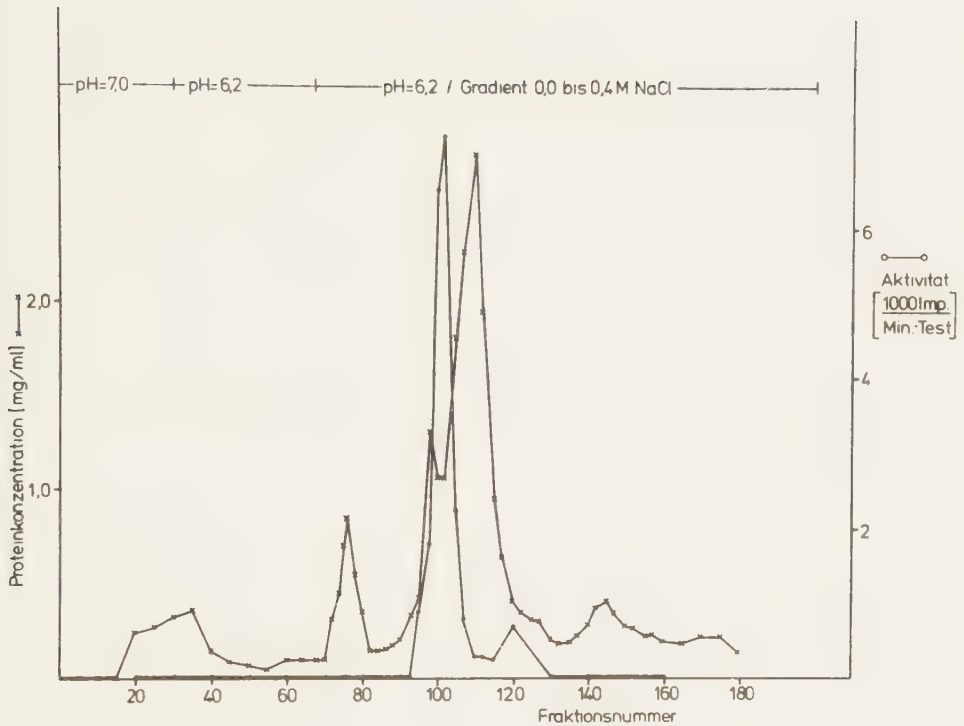


Abb. 28 Chromatographie der Transferase an DEAE-Cellulose  
( Säule: 3,0 cm x 14 cm  
Puffer: 0,02 M Imidazol/HCl, 0,5 mM Thioglykol  
0,5 mM  $MgK_2EDTA$   
Aufgetragenes Protein: 240 mg  
Elution: a) durch Änderung des pH-Wertes von 7,0  
auf 6,2  
b) anschließend durch steigenden NaCl-  
Gradienten von 0 bis 0,4 M NaCl  
bei pH 7,0  
Durchführung s.S. 78 )

ten Auftrennung bei der Cellogel-Elektrophorese abschätzen läßt, daß das erhaltene Protein nur zu maximal 10 bis 20 % aus Transferase bestehen kann. Die Transferase wird bei der Elektrophorese durch Cellogel, nicht jedoch durch Polyacrylamidgel zurückgehalten, was für eine weitere Reinigung verwendet werden könnte.

Eine Übersicht über die Anreicherung der Prenyltransferase ist in Tabelle 5 ( Seite 57 ) wiedergegeben.

#### 7. Aufbewahrung der Transferase

Da die Transferase nur als Hilfsenzym verwendet wurde, erschien es sinnvoll, größere Mengen zu isolieren und aufzubewahren.

Dazu wurden zwei Möglichkeiten verwendet:

a) Die gereinigten Transferase-Lösungen wurden gegen Phosphatpuffer dialysiert und in diesem eingefroren. Nach mehrmonatiger Aufbewahrung bei -15 Grad zeigten sich nur geringe Aktivitätsabnahmen.

( In Imidazol/HCl-Puffer wurde sofortige Desaktivierung festgestellt. )

b) Die Transferase wurde gegen Wasser dialysiert, gefriergetrocknet und bei -15 Grad aufbewahrt. ( Nach Auflösung in Puffer und Abtrennung von ungelöstem Protein wurden merkbar höhere Aktivitätsverluste als bei Methode a festgestellt. )

Tabelle 5

Übersicht über die Anreicherung der Prenyltransferase

(Die Angaben sind Durchschnittswerte aus mehreren Anreicherungen; je nach Ausgangsmaterial wurden Abweichungen von  $\pm 50\%$  beobachtet; Ausgangsmaterial ist jeweils 3 kg Hefe; 1 AE ist diejenige Proteinmenge, die in 1 min. 1  $\mu\text{Mol}$  C-14-IPP umgesetzt)

| Reinigungsstufe                   | Protein<br>mg | Gesamtaktivität<br>AE | Spezifische Aktivität<br>AE/mg | Ausbeute<br>% |
|-----------------------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|---------------|
| Rohextrakt                        | 50 000        | 1000                  | 0,02                           | 100           |
| 1. Ammoniumsulfat-fällung         | 21 000        | 850                   | 0,04                           | 85            |
| Aluminiumoxidge-lüberstand        | 7500 - 9400   | 600 - 750             | 0,08                           | 60 - 75       |
| 2. Ammoniumsulfat-fällung         | 4 700         | 560                   | 0,12                           | 55            |
| Gelfiltration an Sephadex G 200   | 1 150         | 420                   | 0,37                           | 42            |
| Chromatographie an DEAE-Cellulose | 125 - 150     | 250 - 300             | 2                              | 25 - 30       |

## VI) Eigenschaften der Prenyltransferase

### 1. pH-Einfluß auf die Aktivität

Zur Ermittlung des günstigsten pH-Wertes für den Test der Isomerase mit dem Hilfsenzym Prenyltransferase war es nötig, den genauen Einfluß des pH auf deren Aktivität zu kennen (Abb. 29).

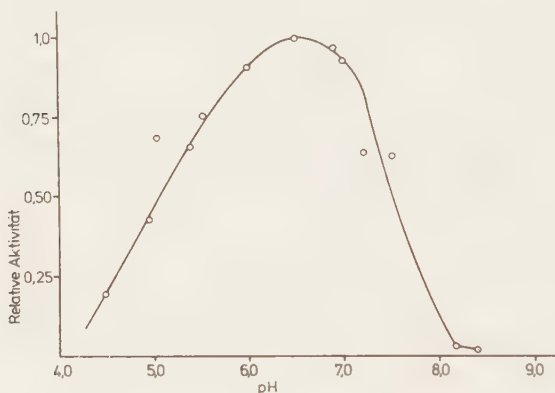


Abb. 29 pH-Einfluß auf die Aktivität der Prenyltransferase

Verwendete Puffer: pH = 4,5 - 6,5 Acetat  
pH = 5,0 - 7,5 Phosphat  
pH = 6,9 - 8,4 Tris/HCl

Die Kurve zeigt ein deutliches Maximum bei pH = 6,5; bei dem für den Isomerase-Test verwendeten pH-Wert von 7,5 wurde noch die Hälfte der maximalen Aktivität gemessen.

### 2. Hemmungen

Im Gegensatz zur Isomerase wurde die Transferaseaktivität durch Jodacetamid nur geringfügig beeinflusst (siehe Verwendung von Jodacetamid zur Hemmung von Isomeraseverunreinigungen beim Transferase-Test).

Mit Diäthylcarbonat konnte bei etwas höherer Konzentration als bei der Isomerase ebenfalls eine Hemmung herbeigeführt werden (Abb. 30).

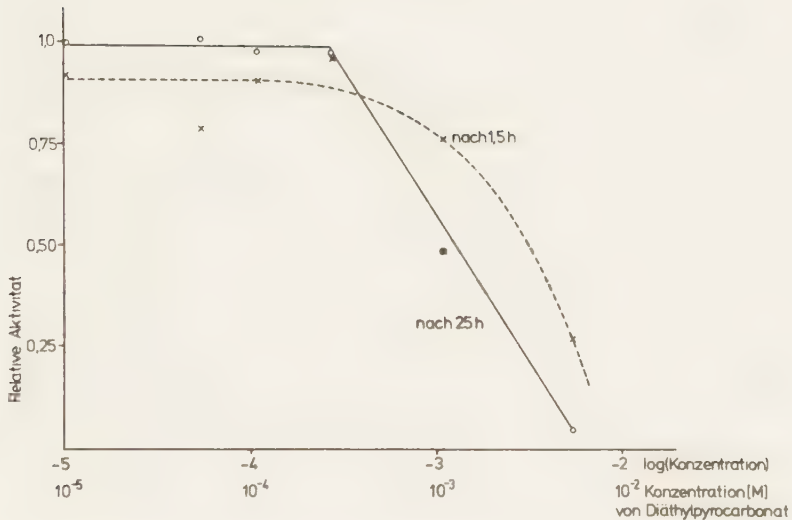


Abb. 30 Hemmung der Transferase durch Diäthylpyrocarbonat  
(Relative Aktivität nach Inkubation mit Diäthylpyrocarbonat in Kaliumphosphatpuffer, pH = 6,0, bei 0° C; Transferasekonzentration: 1,20 mg/ml; Ausführung s.S. 75 )

0,1 M Imidazol/HCl-Puffer führte zur vollständigen Unterdrückung der Transferase-Reaktion.

### 3. Isoelektrischer Punkt

Die Bestimmung wurde wie bei der Isomerase (s.S. 37), jedoch mit Trägerampholyten des Bereiches pH = 3 - 10, durchgeführt. Dabei wurde für die Isomerase der IEP 5,1 erhalten.

#### 4. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex

Gele wie Sephadex sind aus miteinander vernetzten Dextranen aufgebaut, so daß Poren unterschiedlichen Durchmessers entstehen. Je nach Größe können Moleküle mehr oder weniger häufig in die ruhende Flüssigkeit im Inneren des Gels diffundieren, so daß "große" Proteine sich bevorzugt im fließenden Puffer aufhalten, während "kleine" Proteine durch das Eindringen in die Gelmatrix verzögert im Eluat erscheinen. Nimmt man für die chromatographierten Proteine an, daß sie näherungsweise die gleiche Gestalt besitzen, so läßt sich die Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung verwenden.

Es läßt sich zeigen, daß eine angenähert lineare Beziehung besteht zwischen dem relativen Elutionsvolumen (bezogen auf eine Substanz wie Dextranblau, die auf Grund ihrer Größe nicht in das Gel eindringen kann) und dem Logarithmus des Molekulargewichts, soweit die Proteingröße sich im Trennbereich des Gels befindet und keine Veränderung des Gels während der Chromatographie stattfindet.

Nach dieser Methode ergab sich für die Prenyltransferase ein Molekulargewicht von 69 000 (Abb. 31).

#### Molekulargewichte und Abkürzungen zu Abb. 31 :

DB Dextranblau

SA Serumalbumin ( 67 000 )

OA Ovalbumin ( 45 000 )

CHy Chymotrypsinogen ( 25 000 )

CC Cytochrom C ( 12 400 )

$V_E$ : Elutionsvolumen des betreffenden Proteins

$V_O$ : Elutionsvolumen des vom Sephadex-Gel ausgeschlossenen Dextranblaus

$V_E/V_O$ : relatives Elutionsvolumen

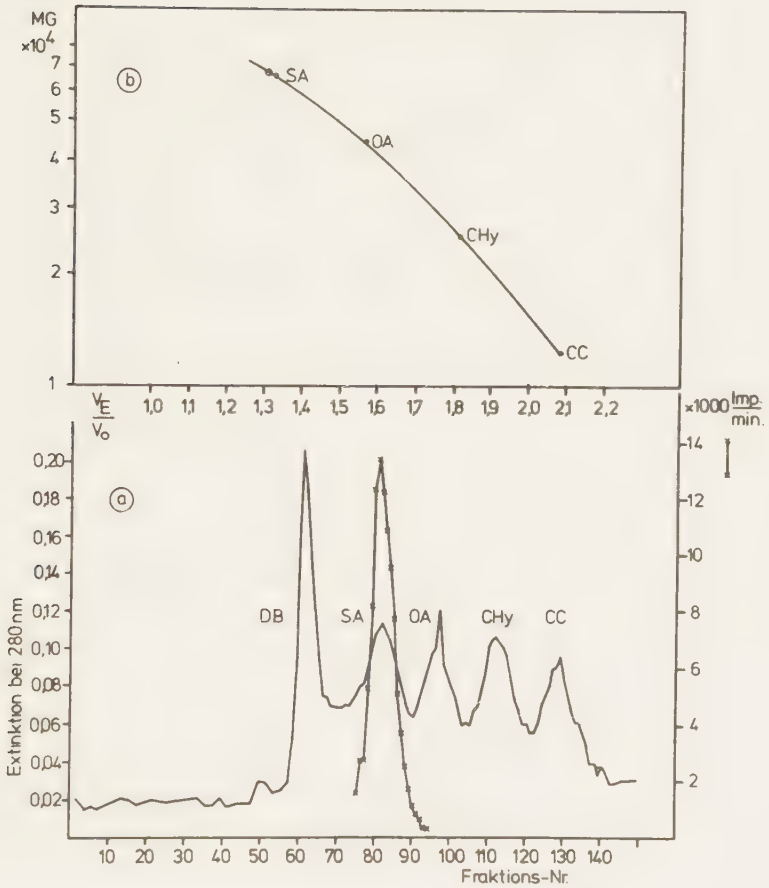


Abb. 31 a) Elutionsdiagramm zur Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G 100  
 b) Auswertung des Elutionsdiagramms  
 ( Erläuterungen Seite 60; Ausführung Seite 78 )

C) Experimenteller Teil

I) Allgemeine Verfahren

1. Verwendete Apparate

Photometer Eppendorf mit Registrieradapter und Fluoreszenz-zusatz 1030, Netheler und Hinz, Hamburg

Spektralphotometer Zeiss, Modell M 4 Q II

Fraktionskollektor UltroRac, Schlauchpumpen Perpex, Durchfluß-photometer Uvicord, Ampholine Elektrofokussier-Ausrüstung LKB 8101, LKB-Produkte, Stockholm

Multichrom-Chromatographiesäulen, Fraktionskollektor Linear Serva-Technik, Heidelberg

Zellhomogenisator nach Merckenschlager, Eigenbau Moosbauer

Zellhomogenisator, Manton-Gaulin, Everett

Radiopapierchromatograph FH 452, Frieske-Hoepfner

Gaschromatograph Aerograph 1700, Varian Aerograph, mit Verbrennungsofen der Firma Packard, Modell 325 und Packard Szintillationsspektrometer 2001 bildeten eine Radiogas-chromatographie-Einheit.

Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 314 EX und Modell 3380

Säuleneluatkonzentrator CEC 1, Ultrafiltrationszellen mit Membranen, Amicon, Oosterhout, Holland

Papierelektrophorese: Pherograph, Original Frankfurt, Hormuth und Vetter

Hochspannungsgleichrichter, CAMAG, Muttenz, Schweiz

pH-Meter, Püsl, München

Flachmembranelektrode Ingold LoT 403-30-M8, Ingold, Frankfurt

## 2. Enzyme, Substrate und Chemikalien

Die Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung und die folgenden Enzyme und Substrate wurden von der Firma C.F.Boehringer, Mannheim bezogen:

PGluM, G6P-DH, UDPG-Pyrophosphorylase,  $\text{NADP}^+$ , UDPG

Nicht eigens angeführte Chemikalien wurden von der Firma E.Merck, Darmstadt erhalten.

Trichloracetonitril, Phenidon ( EGA-Chemie, Steinheim )

Sephadex, Sepharose, Dextranblau ( Pharmacia, Uppsala )

Serumalbumin vom Rind ( Behringwerke, Marburg )

Dowex, Cellogel, alle Chemikalien zur Elektrophorese ( Serva, Heidelberg )

Diäthylpyrocarbonat, 2-Mercaptoäthanol, N-Äthylmaleinimid ( Fluka, Buchs, Schweiz )

Aluminiumoxid ( Woelm, Eschwege )

Aluminiumoxid-Gel nach Willstätter ( Biesterfeld, München )

PPO, Dimethyl-POPOP ( Packard Instruments, Frankfurt )

Ampholine-Lösungen ( LKB, Stockholm )

BrCN, Jodacetamid ( Schuchardt, München )

5-Amino-1-H-tetrazol ( Merck, Darmstadt )

NPGS, Chromosorb W.A.W. ( Varian aerograph, Darmstadt )

Streptomycinsulfat ( C.Roth, Karlsruhe )

C-14- $\text{BaCO}_3$  ( Radiochemical Centre, Amersham, England )

Die verwendete Bäckerhefe wurde bis zum 1. Oktober 1971 von der Firma Scheibe und Schertl, Oberkottzau bei Hof, anschließend von der Firma Bast, Nürnberg, durch die Großhandlung Hefe-Mayr, München, bezogen.

### 3. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurde mit der Biuretmethode nach Beisenherz ( Lit. 62 ) bestimmt.

Bei verdünnten Proteinlösungen wurde die optische Bestimmungsmethode bei 260 und 280 nm nach O.Warburg und W.Christian ( Lit. 63 ) verwendet. Das Verhältnis der Extinktionen bei 280 nm zu 260 nm wurde als  $\beta$ -Wert bezeichnet.

### 4. Radioaktivitätsmessung

Die C-14-Bestimmungen wurden im Szintillationsspektrometer durchgeführt. Petrolätherlösungen und toluollösliche Verbindungen wurden direkt mit Toluolszintillationslösung versetzt und gezählt. Wässrige Lösungen wurden in Dioxanszintillationslösung gemessen.

Toluol-Szintillationslösung:

1000 ml destilliertes und über basisches Aluminiumoxid filtriertes Toluol wurden mit 5 g 2,5-Diphenyloxazol ( PPO ) und 0,5 g 1,4-Bis-2(4-methyl-5-phenyloxazol)benzol ( Dimethyl-POPOP ) versetzt.

Dioxan-Szintillationslösung:

1000 ml Dioxan ( destilliert, mit Aluminiumoxid nachgereinigt ) enthielt 100 g Naphthalin, 10 g PPO, 0,25 g Dimethyl-POPOP.

### 5. Gaschromatographie

Für die Identifizierung der Endprodukte des Enzymtests durch die Radiogaschromatographie wurde der Test mit der doppelten Menge gegenüber dem normalen Ansatz durchgeführt. Zur Beendigung der enzymatischen Reaktion und Isolierung der Endprodukte wurden folgende Methoden angewandt:

a) Zusatz von 0,4 ml Trichloressigsäure zur Hydrolyse der säurelabilen Pyrophosphatester; 10 Min. Inkubation bei 37°C; Zusatz von 0,4 ml 10 N KOH; Extraktion mit Methylbutan ( Siedepunkt: 27,9° );

b) Zusatz von 4,0 ml 0,2 N Glycinpuffer pH 11, 0,05 ml 0,1 M Zinksulfatlösung ( 5  $\mu$ Mol ) und 0,02 mg alkalischer Phosphatase ( E.Coli, 1 mg/ml ), gemessener End-pH-Wert: 9,7; 60 Min. Inkubation bei 37 Grad; Zusatz von 0,5 ml 10 N KOH;

60 min Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ ; Zusatz von 0,5 ml 10 N KOH; Extraktion mit Methylbutan.

Die Methylbutanextrakte wurden in einem spitzen Zentrifugenglas im Wasserbad durch einen darübergeblasenen Luftstrom bis auf ca. 50  $\mu\text{l}$  eingedampft und das an der Glaswand haftende Gemisch mit wenig Äther zu Boden gespült. Die entstehende Ätherlösung wurde nach Vermischen mit nichtradioaktiven Terpenalkoholen mit 5 bis 30 C-Atomen in den  $250^{\circ}$  -  $270^{\circ}$  heißen Injektor des Gaschromatographen eingespritzt. Die Trennung erfolgte auf einer 150 cm langen,  $1/8''$  starken Stahlsäule, die mit 15 % NPGS auf Chromosorb W.A.W., 80 - 100 mesh, gefüllt war. Die Temperatur im Detektorblock betrug  $300^{\circ}$ . Es wurde ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor verwendet. Die Heizstromstärke der Filamente betrug 150 mA. Als Trägergas diente Helium mit einer Strömung von 33 ml pro Minute. Die Temperatur im Säulenofen wurde 3 min auf  $50^{\circ}\text{C}$  gehalten, dann ein Temperaturprogramm gestartet, das mit einer Heizrate von  $8^{\circ}\text{C}$  pro Minute den Säulenofen auf  $240^{\circ}\text{C}$  aufheizte. Diese Temperatur wurde dann 10 min eingehalten.

Die getrennten Verbindungen wurden vom Ausgang des Massendetektors über eine  $300^{\circ}\text{C}$  heiße Verbindungsleitung zunächst einem Verbrennungsofen zugeführt, wo sie in einem  $750^{\circ}\text{C}$  heißen, mit Kupferoxid gefüllten Quarzrohr verbrannt wurden. Nach Abtrennung des entstandenen Wassers durch Magnesiumperchlorat wurde der, das radioaktive  $\text{CO}_2$  enthaltende Heliumstrom in eine Anthracendurchflußzelle geleitet, die sich in einem Szintillationszähler befand. Nach Durchströmen der Zelle wurde das Kohlendioxid in Natronasbest aufgefangen.

Die Zeitdifferenz zwischen Durchströmen des Massendetektors und des Szintillationszählers wurde in Abb. 11 (s.S. 15) bereits berücksichtigt.

## II) Enzymbestimmungen

### 1. Synthese von 1-C-14-Isopentenylpyrophosphat

(Lit. 13, 64 - 67)

#### 1-C-14-Isopentensäure

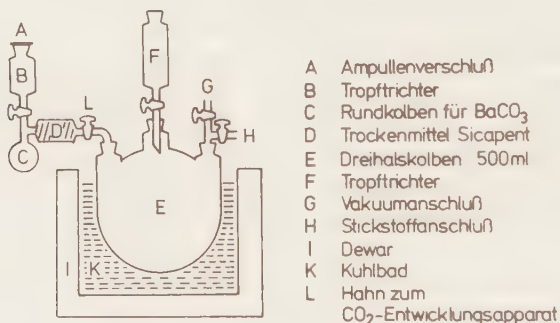


Abb. 32 Apparatur zur Synthese von C-14-Isopentensäure

Die sorgfältig getrocknete Apparatur (Abb. 32) wurde zweimal evakuiert und mit trockenem Stickstoff gefüllt, dann auf 10 Torr evakuiert. Nach Eintauchen des Dreihalskolbens E in flüssigen Stickstoff wurde in der CO<sub>2</sub>-Entwicklungsapparatur B/C aus 2,000 g BaCO<sub>3</sub> und 2 - 10 mCi C-14-BaCO<sub>3</sub> mit 20 ml 50 %iger Perchlorsäure C-14-CO<sub>2</sub> entwickelt und im Kolben E festgefroren. Nach Schließen von Hahn L erfolgte portionsweiser Zusatz von 10 mMol Grignardlösung aus Methallylchlorid in Tetrahydrofuran (THF) durch Tropftrichter F. Nach Eintauchen des Kolbens E in Aceton/CO<sub>2</sub> (-70°) wurden weitere 10 mMol Grignardlösung und THF bis zum Endvolumen von etwa 400 ml portionsweise unter heftigem Rühren zugesetzt, dann weitere 15 min gerührt. Unter Kühlung des Kolbens mit Eiswasser wurde anschließend durch Zugabe von 25 ml 2 N HCl hydrolisiert und die ammoniumchloridgesättigte wässrige Phase viermal mit 3 - 5 ml Äther extrahiert. Die entstandene Säure ließ sich nun aus der Äther/THF-Lösung mit 6 mal 5 ml gesättigter Soda-lösung extrahieren, aus der sie nach vorsichtigem Ansäuern

und Sättigen mit Ammoniumchlorid mit 5 mal 5 ml Äther ausgeschüttelt wurde. Der Extrakt wurde mit 3/4 ml Wasser gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und der Äther abdestilliert. (Ausbeute: 700 - 800 mg undest. Säure, 70 - 80 % d. Th.)

#### 1-C-14-Isopentenol

Nach langsamen Zutropfen der Isopentensäure zu 620 mg  $\text{LiAlH}_4$  in 15 ml Äther wurde 30 min Rückfluß gekocht, dann bei  $0^\circ \text{C}$  mit Wasser hydrolysiert. Die durch Zusatz von 10 ml 2 N HCl angesäuerte Lösung wurde mit Ammoniumchlorid gesättigt und 5 mal mit 4 ml Äther extrahiert. Nach dreimaligem Waschen der Ätherschichten mit je 1,5 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, Trocknung und Abdestillation des Äthers erfolgte Destillation des Isopentenols im Mikrokolben (Kühlung: Aceton/ $\text{CO}_2$ , Siedebereich bei einer Badtemperatur von  $125^\circ$ - $135^\circ$ ) Ausbeute: 350 - 400 mg (53 - 60 % d.Th.).

#### 1-C-14-Dilithiumisopentenylphosphat (1-C-14-IMP)

350 - 400 mg Isopentenol, 0,72 ml trockenes Pyridin (mit  $\text{CaH}_2$  getrocknet) und 0,6 ml trockner Äther wurden unter Rühren bei  $-15^\circ$  zu 0,82 ml dest.  $\text{POCl}_3$  (suprapur) in 1,2 ml abs. Äther getropft, 15 h bei  $-15^\circ \text{C}$  aufbewahrt, abzentrifugiert, die Lösung auf 5 g Eisschnee gegeben und der Rückstand 3 mal mit 4 ml abs. Äther extrahiert. Nach Vertreiben des Äthers mit Stickstoff wurde die wässrige Phase durch Zutropfen von gesättigter  $\text{LiOH}$ -Lösung auf  $\text{pH} = 12$  gebracht, ausgefallenes  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  abzentrifugiert, dieses 5 mal mit 3 ml Wasser gewaschen und nach Neutralisation mit Dowex 50/ $\text{H}^+$  gefriergetrocknet. Der trockene Rückstand wurde mit Äthanol/Äther (5:6 = V:V), Äther, Äthanol/Äther, zweimal mit Äther gewaschen und über  $\text{P}_2\text{O}_5$  aufbewahrt.

Ausbeute: 600 - 650 mg (durch  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  verunreinigt)

75 - 80 % (aus der Radioaktivität errechnet)

#### 1-C-14-Trilithiumisopentenylpyrophosphat

320 mg 1-C-14-IMP wurden in Wasser gelöst, mit Dowex 50/ $\text{H}^+$  in die freie Säure umgewandelt, mit 20 ml tert. Butanol und 0,7 ml dest. Morpholin Rückfluß gekocht. Innerhalb von 45 min wurden 2,0 g Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml tert. Butanol

zugetropft, dann 4 h unter Rückfluß gekocht. Nach Stehen über Nacht erfolgte Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs, der mit 3 mal je 5 ml tert. Butanol gewaschen wurde, Eindampfen der Butanollösungen und Extraktion des Rückstandes mit Äther. Das entstandene Isopentenylphosphormorpholidat wurde 3 mal in abs. Pyridin gelöst und zur Trockene eingedampft, dann eine Lösung von 0,51 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (88 %), 1,8 ml Tributylamin in 5 ml abs. Pyridin (zur Trocknung zweimal eingedampft) zugesetzt, die erhaltene Mischung zur Trockene eingedampft, mit 5 ml abs. Pyridin versetzt und 2 Tage stehen gelassen. Nach Abdestillation des Pyridins wurde der Rückstand in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, LiOH-Lösung bis pH = 12 zugefügt, mit Äther extrahiert, zentrifugiert, der Niederschlag 3 mal mit 3 ml Wasser extrahiert, die wässrigen Lösungen gefriergetrocknet, der Rückstand mit Äthanol/Äther (5:6 = V:V) extrahiert, mit Äther gewaschen, über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet und aufbewahrt.

Ausbeute: 200 - 250 mg (verunreinigt durch  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  und 1-C-14-IMP)

40 - 50 % (aus der Radioaktivität errechnet)

Die Reinigung des IPP erfolgte nach Lit. 68 durch Chromatographie an Dowex 2 x 8/Formiat-Form.

## 2. IPP-Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie

Ca. 20 - 30 mg IPP wurden in Wasser gelöst und auf eine Säule (Länge 9,5 cm, Durchmesser 1 cm) mit Dowex 2x8/Formiat-Form aufgetragen. Nach Waschen mit 30 ml Wasser wurde mit folgenden Gradienten eluiert:

a) 300 ml 0 - 4 N  $\text{HCOOH}$

b) 600 ml 4 N  $\text{HCOOH}$  + 0- 0,8 M  $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$

c) Nachwaschen mit 50 ml 4 N  $\text{HCOOH}$  + 0,8 M  $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$

Die radioaktiven Fraktionen (Abb. 33) wurden bis zu einem Volumen von 10 ml gefriergetrocknet, dann mit Dowex 50/ $\text{H}^+$  die Ammoniumionen entfernt und zur Trockene gefriergetrocknet. Die Identifizierung des eluierten IMP und IPP erfolgte mit Hilfe der Dünnschicht- und Papierchromatographie (Lit. 69, 70) und Papierelektrophorese (Lit. 67).

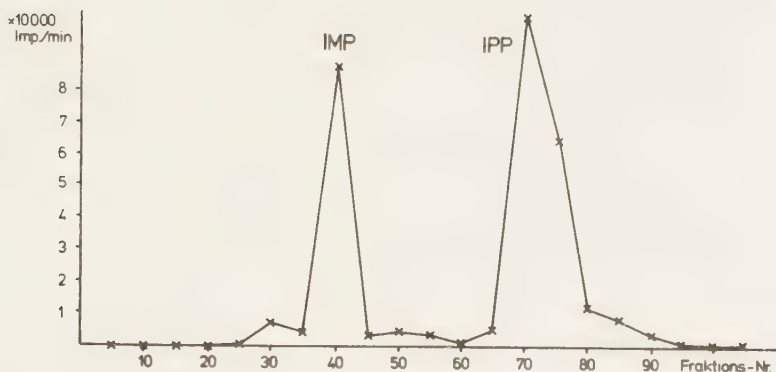


Abb. 33 Reinigung von IPP durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 2x8 (genaue Ausführung S. 68 unten)

Als Vergleichssubstanz diente IPP, das durch enzymatische Synthese aus Mevalonsäure (Lit. 68) erhalten wurde.

Zum Nachweis der Substrate diente  $\text{KMnO}_4$ -Lösung, bzw. zum Nachweis der Phosphate, Phosphatester und Pyrophosphatester das Reagenz nach Lit. 71.

Radioaktive Substanzen wurden nach Papierchromatographie oder -elektrophorese mit Hilfe des Streifenzählers, nach Dünnschichtchromatographie durch Autoradiographie lokalisiert.

### Autoradiographie

Die durch Dünnschichtchromatographie getrennten radioaktiven Substanzen wurden folgendermaßen lokalisiert:

Die Dünnschichtplatte oder -folie wurde bei völliger Dunkelheit mit normalem Filmmaterial bedeckt und ca. 12 - 36 h im Kühlraum bei  $4^\circ \text{C}$  zusammengepreßt.

Für Verbindungen höherer Aktivität (2000 - 5000 dpm) wurde Agfa Isopan Record bzw. Kodak Royal-X-Pan-4166 Film (jeweils als Planfilm), für Substanzen geringerer Aktivität Kodak 2475 Recording-Kleinbildfilm verwendet. Die Entwicklung erfolgte in Jobo-Entwicklungsdosen mit folgender Entwicklerzusammensetzung (Lit. 72):

In 700 ml Wasser (45° C) wurden nacheinander gelöst:

- 100 g wasserfreies Natriumsulfit
- 4 g Hydrochinon
- 2 g Natriumborat
- 8 g Borsäure
- 0,4 g Phenidon (1-Phenyl-pyrazolidon-(3) )
- 0,1 g Kaliumbromid

mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Entwicklungszeit: 12 - 13 min bei 20° C

Fixierung: handelsübliches Fixierbad

### 3. Enzymbestimmungsmethoden

#### a) Isomerase

##### 1. Radioaktive Bestimmungsmethode

40  $\mu$ Mol Tris/Acetat-Puffer (pH = 7,5), 6  $\mu$ Mol  $MgK_2EDTA$ , 4  $\mu$ Mol  $MgCl_2$ , 1 mg Serumalbumin, 2  $\mu$ Mol Cystein, Isomerase und Transferase (im Überschuß) wurden in einem Gesamtvolumen von 0,6 ml bei 37° 10 min inkubiert, 0,3  $\mu$ Mol C-14-IPP zugesetzt und weitere 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,2 ml 3 M Trichloressigsäure beendet. Nach Zusatz von 1 mg Farnesol und 1 mg Nerolidol als Träger in 50  $\mu$ l Aceton und 10 min. Hydrolyse wurde 0,2 ml 10 M KOH zugegeben, 3 mal mit je 2 ml eines Gemisches aus 4 Teilen Petroläther (Siedebereich 40° - 70° C) und 1 Teil Äthanol ausgeschüttelt, die Petrolätherphase mit 0,8 ml Wasser gewaschen, mit 500 mg Natriumsulfat getrocknet und in 10 ml Toluolszintillationslösung gezählt.

##### 2. Fluorimetrische Methode I

Zunächst wurde der Test ähnlich der radioaktiven Bestimmungsmethode durchgeführt:

In einem Gesamtvolumen von 0,6 ml wurden 20  $\mu$ Mol Tris/Acetat-Puffer (pH = 7,5), 6  $\mu$ Mol  $MgK_2EDTA$ , 5  $\mu$ Mol  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ Mol Cystein und Isomerase bei 37° C vorinkubiert, dann die enzymatische Reaktion mit C-12-IPP gestartet, nach 10 min. die Reaktion durch Zusatz von 0,2 ml 2 N HCl gestoppt, nach 10 min Hydrolyse mit 0,4 ml 1 N NaOH neutralisiert.

Endvolumen: 1,25 ml ( = Lösung A)

Zur fluorimetrischen Bestimmung der entstandenen Pyrophosphatmenge wurden im Photometer Eppendorf mit Registrieradapter und Fluoreszenzzusatz 1030 (Primärfilter: Hg 313 + 366 nm zur Fluorometrie; Sekundärfilter: 420 - 3000 nm; Messung der Fluoreszenzstrahlung unter einem Winkel von 30 Grad) bei 25° (Küvettentemperatur) in einem Volumen von 1,75 ml 200  $\mu$ Mol Tris/Acetat-Puffer (pH = 8,0), 5  $\mu$ Mol Magnesiumacetat, 5  $\mu$ Mol NADP<sup>+</sup>, 5  $\mu$ Mol UDPG, 0,2 mg PGluM (gegen 50 mM Acetatpuffer, pH = 5,3, dialysiert), 0,2 mg G6P-DH (gegen 50 mM Phosphatpuffer, pH = 7,5, dialysiert), 0,1 mg UDPG-Pyrophosphorylase 3 min. vorinkubiert, dann 0,2 ml der Lösung A zugegeben. Die Differenz aus Anfangswert und Endwert war proportional der eingesetzten Isomerase-Menge.

Bei Zusatz von 20  $\mu$ g 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wurde bei gleicher Einstellung des Photometers der doppelte Endwert, jedoch nach deutlich längerer Zeit, erhalten.

Da Sulfationen die Reaktion stören, Phosphoglucomutase und Glucose-6-P-Dehydrogenase als Suspension in Ammoniumsulfatlösung geliefert werden, wurden beide Enzyme kurz vor dem Test in dem bei der SDS-Diskelektrophorese beschriebenen Gerät dialysiert.

### 3. Fluorimetrische Methode II

Aufbau und Zubehör des Photometers wie bei Methode I.

Die Küvette enthielt bei einem Gesamtvolumen von 2,1 ml:

200  $\mu$ Mol Tris/Acetat-Puffer (pH = 7,5), 5  $\mu$ Mol Magnesiumacetat, 5  $\mu$ Mol NADP<sup>+</sup>, 5  $\mu$ Mol UDPG-Pyrophosphorylase, 0,3  $\mu$ Mol C-12-IPP und Transferase. Nach dem Start der Reaktion mit Isomerase wurde die Änderung der Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit von der Zeit bei 30° beobachtet

#### b) Transferase

40  $\mu$ Mol Phosphatpuffer (pH = 6,5), 1 mg Serumalbumin, 4  $\mu$ Mol MgCl<sub>2</sub>, 6  $\mu$ Mol K<sub>2</sub>MgEDTA, 12  $\mu$ Mol Jodacetamid und Enzym wurden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml bei 37° 10 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,2  $\mu$ Mol C-12-DMAPP und 0,3  $\mu$ Mol C-14-IPP gestartet und nach 10 min. mit 0,2 ml

3 M Trichloressigsäure abgebrochen. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei der radioaktiven Bestimmungsmethode der Isomerase.

### III) Reinigung der IPP-Isomerase

Die Hefe wurde sofort nach Anlieferung verarbeitet. Alle Operationen wurden bei 4° C im Kühlraum durchgeführt, wenn nicht anders angegeben.

#### 1. Aufschluß mit Toluol

15 kg kalte Hefe wurden in 1,5-kg-Portionen in 3000 ml Bechergläsern mit je 90 ml Toluol 45 min. im Wasserbad bei 37° C gründlich geknetet (Endtemperatur der Hefe: 25°- 30° C), dann mit gesättigter Kaliumphosphatlösung pH = 9,0 - 9,2 eingestellt und 45 min. auf diesem Wert gehalten (Glaselektrode). Der dünnflüssige Teig wurde in gekühlten Zentrifugen bei 5000 bis 9000 g abzentrifugiert, der Überstand durch ein Tuch filtriert und die erhaltene klare Lösung 12 h gegen das zwanzigfache Volumen Wasser, das zweimal gewechselt wurde, dialysiert.

#### 2. Adsorption an Aluminiumoxidgel

Der pH-Wert der dialysierten Proteinlösung wurde mit 2 N Essigsäure auf 6,2 eingestellt, Aluminiumoxid zugegeben (Verhältnis Protein : Gel = 2 : 1) und 30 min gerührt. Nach Abzentrifugation wurde das Gel mit Wasser (1 ml Wasser pro 30 mg Gel) gewaschen und der Überstand nach Abzentrifugation verworfen. Anschließend wurde das Gel mit 0,2 M Phosphatpuffer (pH = 7,0; 1 ml Puffer pro 60 mg Gel) gründlich geplümpert und anschließend zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zwei- bis dreimal wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden gegen die fünfzehn- bis zwanzigfache Menge Wasser, das zweimal gewechselt wurde, 12 h dialysiert.

#### 3. Fällung mit Streptomycinsulfat und Fraktionierung mit Diammoniumhydrogenphosphat

Die Proteinlösungen wurden mit einer konzentrierten Lösung von Streptomycinsulfat (0,8 bis 1 mg Streptomycinsulfat pro mg Protein) versetzt, 10 min. gerührt, dann 30 min. abzentrifugiert.

Der Überstand wurde nun sehr langsam unter Eiskühlung mit kaltem Diammoniumhydrogenphosphat (350 g/l) versetzt und 30 min. gerührt. In den nach Abzentrifugation erhältlichen klaren Überstand wurde sehr langsam 180 g Diammoniumhydrogenphosphat pro Liter eingerührt. 30 min. nach der Zugabe wurde 60 min abzentrifugiert.

#### 4. Gelfiltration

Der Niederschlag wurde konzentriert in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH = 7,2, aufgenommen und auf eine Sephadex-G-100-Säule (Durchmesser 10 cm, Länge 90 cm, Inhalt 7000 ml), äquilibriert mit 0,02 M Tris/HCl-Puffer (pH = 7,2; 2 % Glycerin; 5 mM Thio-glykol, 0,25 mM  $\text{MgK}_2\text{EDTA}$ ), gepumpt (Beladung: maximal 0,5 mg Protein pro ml Sephadex der ersten Säule).

Am Ende der Säule wurden die folgenden Geräte in der angeführten Reihenfolge angeschlossen (Abb. 34):

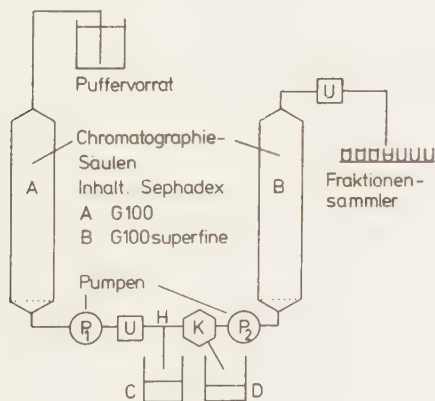


Abb. 34 Chromatographie an Sephadex G 100 und Sephadex G 100 superfine unter Verwendung des Säuleneluatkonzentrators CEC 1 von Amicon (Schaltplan; Erläuterung im Text)

- $P_1$  Pumpe (Förderleistung: 140 ml/h)  
U Durchflußphotometer  
H Dreiwegehahn  
K Säuleneluatkonzentrator CEC 1 (Membran: PM 10)  
 $P_2$  Pumpe (Förderleistung: 40 ml/h)

Anschließend wurde die Lösung durch eine zweite Säule B (Durchmesser 7,5 cm; Länge 100 cm; Inhalt 4400 ml Sephadex G 100 superfine im gleichen Puffer wie oben) gepumpt.

Die Geschwindigkeiten der beiden Pumpen  $P_1$  und  $P_2$  müssen so aufeinander abgestimmt sein, daß einerseits eine genügende Konzentrierung erfolgt (ca. 100 ml Puffer/h wurden durch die Membran abgetrennt), andererseits die Säulen nicht durch zu hohe Geschwindigkeit bzw. Druck verstopfen.

Die inaktiven Teile des Eluates der ersten Säule wurden vor dem Konzentrator mit Hilfe des Dreiwegehahnes H abgetrennt (C). Die isomerasehaltigen Fraktionen wurden nach weiterer Auftrennung in Säule B ohne Änderung der Chromatographie an DEAE-Cellulose unterworfen.

#### 5. Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die aktiven Fraktionen wurden unter Druck auf eine DEAE-Cellulose-Säule gepumpt (Länge: 18 - 20 cm; Puffer wie bei Gelfiltration; Vorbehandlung der DEAE-Cellulose genau nach Lit. 73; max. 2 - 3 mg Protein/ml Austauscher). Nach dem Nachwaschen mit etwa dem 1,5-fachen Säulenvolumen des gleichen Puffers wurde ein Natriumchlorid-Gradient (von 0 - 0,5 M NaCl) im 6 bis 8-fachen Säulenvolumen des gleichen Puffers aufgesetzt und das Eluat fraktioniert aufgefangen.

Die dabei erhaltenen Isomerase-Lösungen wurden für die Mehrzahl der Versuche verwendet. Sie waren nach NaCl-Entfernung mit nur geringen Aktivitätsverlusten einige Monate haltbar nach Zusatz von 10 - 15 % Glycerin und Aufbewahrung bei  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Zur Konzentrierung wurden die durch DEAE-Cellulose-Chromatographie erhaltenen Proteine nach kurzer Dialyse zur Entfernung des Hauptteils an NaCl auf eine DEAE-Cellulose-Säule (ca. 2 mg Protein/ml Austauscher) gegeben, mit einem Säulenvolumen Puffer (Zusammensetzung wie bei Gelfiltration) nachgewaschen, dann eluiert mit 0,5 M NaCl im gleichen Puffer. Die konzentrierten aktiven Fraktionen wurden anschließend durch Gelfiltration an Sephadex G 10 entsalzt.

Die weitere Reinigung durch Dünnschichtelektrofokussierung ist auf Seite 83 bei den elektrophoretischen Methoden ausführlich beschrieben.

## 6. Affinitätschromatographie

Die Ausgangsamine (6-Amino-2-methylhepten-(2) und 5-Amino-2-methyl-hexen-(1) ) wurden aus den entsprechenden Ketonen durch Reduktion ihrer Oxime mit Lithiumaluminiumhydrid hergestellt.

Die Kupplung der Amine an Sepharose erfolgte nach Lit. 34: 20 ml Sepharose 4 B wurden nach fünfmaligem Waschen mit je 100 ml Wasser auf einer groben Glasfritte (G 2) abgesaugt und in 20 ml Wasser suspendiert. 5 g fein gepulvertes BrCN wurden rasch zugegeben und das pH auf 11 mit 2 N NaOH gehalten unter Kühlung von außen und durch Zugabe von Eis auf max. 20° C. Nach 15 min. wurde durch Eiszugabe rasch auf 4° abgekühlt, auf der Glasfritte abgesaugt und rasch mit 200 ml kaltem Puffer gewaschen.

Die aktivierte Sepharose wurde zu 20 ml der Aminlösung (40 mMol Amin, mit 6 N HCl auf pH 10 eingestellt) gegeben. Nach 16 h bei 4° wurde das Gel mit 1000 ml Wasser gewaschen und mit Puffer äquilibriert.

Auf die in eine Säule gefüllte Sepharose wurde die Isomerase aufgetragen und nach Nachwaschen mit Puffer (0,02 M Tris/HCl, pH = 7,2) durch einen NaCl-Gradienten bis 1 M NaCl eluiert.

### IV) Hemmung der Isomerase

#### 1. Hemmung mit Diäthylpyrocarbonat

100 µg Isomerase in 1 ml 0,1 M Kaliumphosphat pH = 6,0 wurden bei 0° mit 0,01 bis 6 µMol Diäthylpyrocarbonat in 0,1 ml Äthanol versetzt. Nach 10 bzw. 60 min. und 24 h wurde die Aktivität nach Zusatz von 10 µMol Cystein (statt 2 µMol) beim Test bestimmt.

#### 2. Hemmung mit 5-Diazo-1-H-tetrazol

1 g 5-Amino-1-H-tetrazol wurden in 23 ml 1,6 N HCl gelöst und im Eisbad durch langsame Zugabe von 0,7 g Natriumnitrit in 10 ml Wasser diazotiert. Der pH-Wert der stark sauren Lösung wurde kurz vor dem Vermischen mit Protein- oder Aminosäurelösungen mit Kalilauge auf pH = 5,0 gebracht. Die Bestimmung

der Konzentration erfolgte nach Reaktion mit einem Überschuß an Histidin durch Messung der Absorption bei 360 nm.

1 ml Isomerase (0,15 mg) in 0,13 M Bicarbonatpuffer, pH = 8,6, wurden mit 2 ml 0,67 M Bicarbonatpuffer und 0,4 ml Diazotetrazollösung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann durch Zusatz von 0,2 ml 0,2 M Tris/Acetat-Puffer, pH = 7,5, die Reaktion abgestoppt. Mit aliquoten Teilen erfolgte die Messung der Aktivität.

### 3. Hemmung mit ASPM

ASPM wurde nach Lit. 74 hergestellt und durch mehrmalige Umkristallisation aus Äthanol unter Aktivkohlezusatz gereinigt.

0,5 ml (30 µg) Isomerase, 0,4 ml 0,2 M Kaliumphosphat- (pH = 6,0) oder Tris/HCl-Puffer (pH = 7,2) und 0,01 bis 10 µMol NEM bzw. ASPM in 0,1 ml wurden bei 0° C 5, 10 und 20 min inkubiert, dann 0,2 ml (200 µMol) Cysteinlösung zugegeben und in 0,2 ml die Testaktivität gemessen.

### V) Anreicherung der Prenyltransferase

Nach Anlieferung wurde die Hefe 2 - 3 Wochen im Kühlraum bei 4° C gelagert. Alle Operationen wurden bei 4° C durchgeführt.

#### 1. Aufschluß

Die Zellen wurden entweder im Zellhomogenisator nach Merckenschlager (Lit. 60) oder im Manton-Gaulin-Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen.

Zellhomogenisator: 1 Teil Hefe, 2 Teile 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 7,0) und 3 Teile Glasperlen wurden etwa 90 sec unter Kühlung heftig geschüttelt. Nach kurzem Stehen wurde der von den Glasperlen dekantierte Überstand zentrifugiert.

Manton-Gaulin-Homogenisator: 2 Teile Hefe wurden in 1 Teil 0,2 M Phosphatpuffer (pH = 7,0) und 1 Teil Wasser suspendiert und zweimal unter Kühlung bei 550 kg/cm<sup>2</sup> durch die Presse geschickt.

## 2. Ammoniumsulfatfällung

Zur Entfernung von Glasperlen und Zellteilen wurde 60 min bei 9000 g zentrifugiert.

Der trübe Überstand wurde bis zu 40 % Sättigung langsam mit Ammoniumsulfat (226 g/l) versetzt, 30 min gerührt, 60 min zentrifugiert. Zur Lösung wurden 89 g Ammoniumsulfat pro Liter (bis 55 % Sättigung) zugegeben, nach 30 min Rühren wurde wieder abzentrifugiert. Das bei Zusatz von weiteren 127 g pro Liter bis zu einer Sättigung von 75 % ausfallende Protein wurde nach Isolierung durch Zentrifugation in 0,02 M Phosphatpuffer (pH = 7,0) gelöst und über Nacht gegen die 40 - 50-fache Menge des gleichen Puffers, der zweimal gewechselt wurde, dialysiert.

## 3. Reinigung mit Aluminiumoxid-Gel

Die dialysierte Lösung wurde mit Wasser, Phosphatpuffer (pH = 7,0) und Aluminiumoxid-Gel versetzt bis zu einer Endkonzentration von 0,02 Mol Phosphat, 8000 mg Protein und 4000 mg Aluminiumoxid-Gel pro Liter. Nach 30 min Rühren wurde das Gel nach Abzentrifugation verworfen.

## 4. Zweite Ammoniumsulfatfällung

Der Überstand der Geladsorption wurde bis 60 % mit Ammoniumsulfat (361 g/l) gesättigt, mit konz. Ammoniak ein pH-Wert von 8,0 eingestellt (Glaselektrode), 30 min gerührt, dann 60 min abzentrifugiert. Der bei Zusatz von 62 g Ammoniumsulfat pro Liter (bis 70 % Sättigung) ausfallende Protein-niederschlag wurde möglichst konzentriert im Elutionspuffer der Gelfiltration aufgenommen.

## 5. Sephadex-G-200-Filtration

Die konzentrierte Proteinlösung wurde vorsichtig auf eine Sephadex-G-200-Säule (8,0 cm x 110 cm; Volumen: 5600 ml), die mit 0,02 M Imidazol/HCl-Puffer (pH = 7,0; 0,5 mM Thio-glykol; 0,5 mM  $\text{MgK}_2\text{EDTA}$ ) äquilibriert war, durch Unterschichten aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Auftrag maximal 0,5 mg pro ml Sephadex. Das Eluat wurde in einem Durchflußphotometer bei 280 nm analysiert und in 30 ml

Fraktionen aufgefangen. Die Enzymaktivität erschien nach einem Elutionsvolumen von 3000 ml.

Die Isomerase-haltigen Fraktionen wurden nach Pufferwechsel durch Dialyse oder Sephadex-G-25-Filtration mit 185 mg Jodacetamid pro Liter versetzt, dann nach JAA-Entfernung entweder in Phosphatpuffer (pH = 7,0) eingefroren oder pufferfrei gefriergetrocknet. Dieses Protein wurde nach langsamem Auftauen oder Lösen in Puffer für Vorversuche verwendet.

#### 6. Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die isomerasefreien Fraktionen wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (vorbereitet nach Lit. 73) der Länge 17 - 20 cm (3 - 4 mg Protein pro ml Austauschere) aufgepumpt, mit einem Säulenvolumen Puffer pH = 7,0, dann mit dem gleichen Volumen Puffer pH = 6,2 nachgewaschen, anschließend ein Gradient aufgesetzt von 0 bis 0,4 M NaCl in etwa dem vierfachen Säulenvolumen Puffer pH = 6,2.

Als Puffer wurde jeweils 0,02 M Imidazol/HCl-Puffer (0,5 mM Thioglykol; 0,5 mM  $\text{MgK}_2\text{EDTA}$ ) verwendet.

Die aktiven Fraktionen wurden nach Gelfiltration an Sephadex G 25, äquilibriert mit dem betreffenden Testpuffer, zur Isomeraseaktivitätsbestimmung eingesetzt.

#### VI) Molekulargewichtsbestimmung nach der Sephadex-Methode (Lit. 75, 76)

In eine Chromatographie-Säule der Länge 160 cm (Durchmesser 2 cm) wurde Sephadex G 100, in 0,02 M Tris/HCl-Puffer (pH = 7,2; Zusatz von 20 ml Glycerin, 100 mg  $\text{MgK}_2\text{EDTA}$ , 0,1 ml Mercaptoäthanol, 6 g NaCl pro Liter) suspendiert, eingefüllt. Als Eichsubstanzen dienten: 1,5 mg Cytochrom C, 2 mg Chymotrypsinogen, 2 mg Ovalbumin, 2,5 mg Serumalbumin und zur Ermittlung des Ausschlussvolumens Dextranblau 2000. Die Substanzen wurden nach Vermischen mit 0,25 ml, gegen den Elutionspuffer dialysierter, Isomerase- bzw. Transferase-Lösung durch vorsichtiges Unterschichten auf die Säule gebracht. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 15 Tropfen gesammelt, in denen die

Eichproteine und Dextranblau bei 280 nm optisch bestimmt wurden. Zur Aktivitätsbestimmung der Isomerase bzw. der Transferase diente die radioaktive Methode.

Auf eine Eichung des Tropfenvolumens wurde verzichtet, da eine Änderung des Volumens in die Form der Kurve der Abb. 31 eingeht.

## VII) Elektrophoresen

### 1. Papierelektrophorese

Papierelektrophoresen wurden in einer Apparatur nach Wieland-Pfleiderer auf Papier Schleicher und Schüll SS 2043 b (gewaschen) oder Whatman No. 1 bei 40 - 50 V/cm durchgeführt. (Puffer: 100 ml Pyridin / 8 ml Eisessig / 2400 ml Wasser, pH = 6,2)

### 2. Säulenelektrophorese

Die Säulenelektrophorese wurde durchgeführt in einer Serva-Chromatographie-Säule (Länge 60 cm, Durchmesser 2,5 cm) mit Kühlmantel, deren Endstücke nach Lit. 38 abgewandelt wurden. Trägermaterial: Sephadex G 100 (Lit. 77)

Puffer: 0,02 M Tris/HCl, pH = 6,8 (Zusatz von 5 % Glycerin)

Spannung: ca. 250 V (Kathode oben)

Stromstärke: 10 mA

Auftrag: Proteinlösung wie bei Gelfiltration mit Auftragsieb auf Sephadex gegeben, etwa 2 cm in Gelbett eingespült.

Rückgewinnung durch Elution an unteren Ende

Dauer: 32 Stunden

Temperatur: 2°

### 3. Diskelektrophorese

Die Diskelektrophoresen zur Überprüfung der Enzymreinheit wurden durchgeführt in einer Apparatur wie bei M. Sumper (Lit. 78) beschrieben. Dabei wurde bevorzugt das Gel Nr. 6 nach Lit. 79 verwendet.

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele längs geschnit-



In das Oberteil E führte über das Anschlußstück F (Multi-fittkupplung der Firma Serva, Heidelberg) der Verbindungsschlauch zur Pumpe. Zur Dialyse wurde das Gerät auf den Kopf gestellt und durch das Oberteil der Dialysepuffer gepumpt, der nach Vorbeifließen an der Dialysemembran B durch den Ring C nach außen trat. Nach Beendigung der Dialyse wurde das Gerät zurückgedreht, das Anschlußstück F herausgeschraubt, vorsichtig der Dialysepuffer abgesaugt, dann mit einer Mikroliterpipette die Dialysemembran durchstoßen und die Proteinlösung aufgenommen.

Die Elektrophorese wurde in dem gleichen Gerät wie die normale Diskelektrophorese durchgeführt.

Gelröhrchen: Innendurchmesser: 6 mm, Länge: 150 mm

Gelpuffer: 7,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

38,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

2,0 g SDS in 1000 ml Lösung

Acrylamidlös.: 22,2 g Acrylamid

0,6 g Methylenbisacrylamid in 100 ml Lösung

Gelherstellung: 15 ml Gelpuffer wurden nach Entgasen im Wasserstrahlvakuum mit 13,5 ml Acrylamidlösung vermischt. Nach weiterer Entgasung wurden 1,5 ml Ammoniumpersulfatlösung (15 mg/ml) und 0,045 ml von N,N,N',N'-Tetramethyläthylendi-amin zugefügt und nach Durchmischen in die unten mit Parafilm verschlossenen Röhrchen gefüllt.

Elektrodenpuffer: 250 ml Gelpuffer auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt

Elektrophorese: 0,005 ml Bromphenolblau (0,05 %ige Lösung in Wasser), 1 Tropfen Glycerin, 0,005 ml Mercaptoäthanol, 0,05 ml Dialysepuffer und 0,01 - 0,05 ml Proteinlösung wurden gemischt, über das Gel in den Trennröhrchen wurde Elektrodenpuffer gefüllt und die proteinhaltige Lösung vorsichtig unterschichtet. Die Elektrophorese wurde unter Stromstabilisierung bei 8 mA pro Röhrchen durchgeführt.

Färbelösung: 22 ml Methanol

22 ml Wasser

4,5 ml Eisessig

125 mg Coomasie brilliant blau R

Entfärbelösung: 75 ml Eisessig  
870 ml Wasser  
50 ml Methanol

## VIII) Isoelektrische Fokussierung

### 1. Säulenisoelektrofokussierung

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde die Fokussierung in einer serienmäßigen kühlbaren Säule (LKB 8101, Volumen 110 ml) gemäß der Bedienungsanleitung durchgeführt (Lit. 80). Als Anodenflüssigkeit (innen) wurde eine Lösung aus 0,2 ml konz. Phosphorsäure, 12 g Zucker und 14 ml Wasser verwendet. Darauf wurde ein Gradient aus folgenden Lösungen aufgebaut:

- a) 2 ml 40 %ige Ampholine-Lösung (LKB, pH-Bereich 3 - 6),  
42 ml Wasser, 28 g Saccharose
- b) 2 ml 40 %ige Ampholine-Lösung, 58 ml Proteinlösung und  
Wasser

Die äußere Kathodenflüssigkeit bestand aus 0,2 ml Äthanolamin und 10 ml Wasser.

Die Elektrofokussierung dauerte etwa 40 h bei einer Anfangsspannung von 250 V (Stromstärke 3 mA), die allmählich auf 600 V erhöht wurde.

Der Säuleninhalt wurde nach Beendigung des Laufs vorsichtig ausgepumpt und in Fraktionen von je 1 ml gesammelt.

### 2. Diskisoelektrofokussierung

Zur Untersuchung der Enzymreinheit wurde neben der Diskelektrophorese die Diskisoelektrofokussierung in Polyacrylamidgel in der gleichen Apparatur durchgeführt.

Röhrchen: Innendurchmesser 7,5 mm; Länge 150 mm

Kathodenlösung (oben): 0,4 %ige wässrige Äthanolamin-Lösung

Anodenlösung (unten): 0,2 %ige Phosphorsäure

Gelzusammensetzung:

0,3 ml 40 %ige Ampholine-Lösung (pH = 3 - 6)

3 ml einer wässrigen Lösung von 30 g Acrylamid und

0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid in 100 ml

7 ml einer wässrigen Lösung von 140 mg Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml

1 ml Wasser

0,8 ml 1 %ige TEMED-Lösung

Das Gel wurde je Röhrchen mit 0,05 - 0,1 ml eines Gemisches aus 0,01 ml 40 %iger Ampholine-Lösung und 0,150 ml 5 %iger Zuckerlösung bedeckt, die dann unterschichtet wurde mit 0,05 ml eines Gemisches aus 0,05 ml Protein, 0,01 ml Ampholine-Lösung und 0,04 ml 10 %iger Zuckerlösung.

Bei einer Spannung von 200 - 400 V dauerte die isoelektrische Fokussierung etwa 12 h.

Fixierung und Anfärbung erfolgte wie in Lit. 81 beschrieben.

### 3. Dünnschichtisoelektrofokussierung

Zur Enzymreinigung wurde die isoelektrische Fokussierung auf Dünnschichtplatten (18 cm x 27 cm) auf der gekühlten Platte einer Wieland-Pfleiderer-Papierelektrophorese-Apparatur durchgeführt.

Die Trägerschicht bestand aus einem Gemisch von:

7,8 g Sephadex G 75 superfine

90 ml Wasser

12 ml 80 %igem Glycerin

4 ml 40 %iger Ampholine-Lösung (pH-Bereich 3 - 6)

Nach Auftragen der Schicht auf die Glasplatte bei Raumtemperatur wurde mit einem Ventilator solange ein Luftstrom zur Trocknung darübergeblasen, bis sich bei Schrägstellung der Platte (45 Grad) die Schicht nicht mehr bewegte (Lit. 40 - 42). Dann wurde die Glasplatte in die Elektrophorese-Apparatur gelegt, die Elektroden aufgebracht (Konstruktion Abb. 36) und mit einer Glasplatte nach oben abgeschlossen.

Elektrodenlösung: Kathode: 2 %iges Äthanolamin

Anode: 2 %ige Phosphorsäure

Die anfängliche Stromstärke von 9 mA (bei 300 V) sank nach spätestens 20 h auf 1 - 2 mA. Nach Abschalten des Stromes wurde der pH-Gradient mit einer Flachmembran-Glaseinstabmeßkette (Ingold LoT 403-30-M8) gemessen, im pH-Bereich von

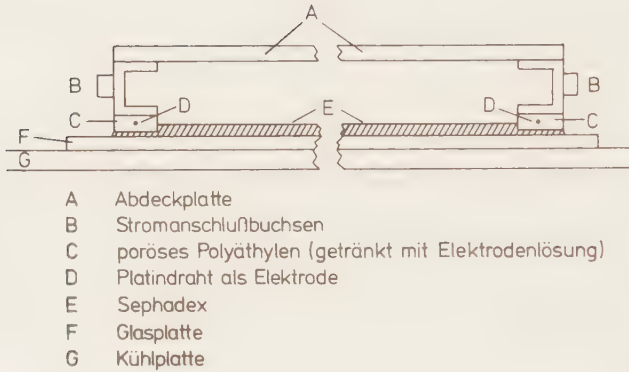


Abb. 36    Apparatur zur Dünnschichtelektrofokussierung in Sephadex

etwa 4,8 - 5,2 (Lit. 39) das Sephadex-Gel entfernt und ersetzt durch eine Mischung aus 10 ml (1,5 mg) Isomerase-Lösung, 700 mg Sephadex G 75 superfine und 0,5 ml 40 %iger Ampholine-Lösung (pH = 3 - 10). Nach weiteren 16 h Elektrofokussierung wurde das Gel in etwa 5 mm breiten Bahnen abgekratzt, in kleine Säulen überführt, mit 0,2 M Tris/HCl-Puffer (pH = 7,5) eluiert und die Enzymaktivität bestimmt. Die Proteinlokalisierung wurde nach der Abklatschmethode mit Papier Whatman No.1 durchgeführt:

Nach Fixierung des Proteins durch Waschen des Papiers mit 10 %iger Trichloressigsäure wurde das Ampholine durch Waschen mit einer Mischung aus 60 ml Methanol, 133 ml Wasser und 20 ml Eisessig entfernt. Anschließend wurde mit einer 0,1 %igen Lösung von Coomasie Brilliant Blau R-250 in Methanol-Wasser-Eisessig (50:50:10) das Protein angefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Methanol-Wasser-Eisessig (33:66:10).

#### D) Zusammenfassung

Die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase wurde aus Bäckerhefe isoliert. Nach etwa 800facher Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt verhielt sie sich elektrophoretisch einheitlich.

Zur Aktivitätsbestimmung wurden mehrere Methoden ausgearbeitet: zunächst radioaktive Testmöglichkeiten, die auf der Säureempfindlichkeit der Reaktionsprodukte beruhen, dann fluorimetrische Methoden, die eine Pyrophosphatbestimmung auf enzymatischem Weg beinhalten.

Aus der Gelfiltration und der SDS-Diskelektrophorese ergab sich eine Molekulargewicht von 37 000 - 41 000. Der isoelektrische Punkt lag bei pH 4,4, das Optimum der Aktivität der angereicherten Isomerase bei pH 8 (kein breites Aktivitätsoptimum!).

Durch Hemmversuche wurde als für die enzymatische Reaktion wichtige Gruppe neben dem bereits bekannten Cystein ein Histidin-Rest nachgewiesen. Zur Deutung der Versuche wird ein Mechanismus angegeben, der mit den vorausgegangenen Versuchen von Lengsfeld und Cornforth in Einklang steht.

Zur Durchführung der neu ausgearbeiteten Isomerase-Tests wurde das dazu benötigte Hilfsenzym, die Prenyltransferase (Farnesylpyrophosphat-Synthetase), aus Bäckerhefe etwa 100fach angereichert.

Die Transferase war in einem breiten pH-Bereich aktiv mit einem Optimum bei pH 6,5; der isoelektrische Punkt lag bei pH 5,1; das Molekulargewicht wurde nach der Sephadex-Methode zu 69 000 bestimmt.

E) Literaturverzeichnis

1. A.Butenandt, Angew.Chemie 72 (1960) 645
2. E.Dane, Naturwissenschaften 30 (1942) 333
3. R.Sonderhoff, H.Thomas, Liebigs Ann.Chem. 530 (1937) 195
4. K.Bloch, E.Borek, D.Rittenberg,  
J.Biol.Chem. 162 (1946) 441
5. G.Popják, Annual Rev.Biochem. 27 (1958) 533
6. R.G.Langdon, K.Bloch, J.Biol.Chem. 200 (1953) 129, 135
7. L.D.Wright, E.L.Cresson, H.R.Skeggs, G.D.E.MacRae,  
C.H.Hoffmann, D.E.Wolf, K.Folkers  
J.Amer.chem.Soc. 78 (1956) 5273
8. F.Lynen, H.Eggerer, U.Henning, I.Kessel,  
Angew.Chem. 70 (1958) 738
9. G.Popják, L.Gosselin, L.Y.Gore, R.G.Gould  
Biochem.J. 69 (1958) 238
10. L.Ruzicka, Experientia 9 (1953) 357
11. B.W.Agranoff, H.Eggerer, U.Henning, F.Lynen,  
J.Biol.Chem. 235 (1960) 326
12. H.Eggerer, Liebigs Ann.Chem. 657 (1962) 212
13. H.J.Lengsfeld, Dissertation München 1968
14. D.H.Shah, W.W.Cleland, J.W.Porter,  
J.Biol.Chem. 240 (1965) 1946
15. P.W.Holloway, G.Popják, Biochem.J. 104 (1967) 57
16. P.W.Holloway, G.Popják, Biochem.J. 106 (1968) 835
17. K.Ogura, T.Nishino, Sh.Seto, J.Biochemistry 64 (1968) 197
18. J.W.Cornforth, K.Clifford, R.Mallaby, G.T.Phillips,  
Proc.R.Soc.Lond.B. 182 (1972) 277
19. K.Kirschner, Dissertation München 1961
20. R.E.Reeves, L.K.Malin, Analytical Biochemistry  
28 (1969) 282-287
21. R.J.Guillory, R.R.Fisher, Analytical Biochemistry  
39 (1971) 170-180
22. Biochemica-Dienst Nr. 17, Boehringer Mannheim, 1971
23. F.Lynen, B.W.Agranoff, H.Eggerer, U.Henning, E.M.Möslein  
Angew.Chem. 71 (1959) 659
24. G.DiPrisco, H.J.Strecker, FEBS Letters 6 (1970) 89
25. M.Kunitz, J.gen.Physiol. 35 (1952) 423
26. J.Porath, H.Bennich, Arch.Biochem.Biophys.Supplement  
1 (1962) 152
27. L.Moravek, J.Chromatography 59 (1971) 343-348

28. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala,  
Separation-Bulletin, 29.9.69
29. W.Brümmer, Kontakte ( Merck ) ( 1974 ) 23
30. P.Cuatrecasas, Agricultural and Food Chemistry  
19 ( 1971 ) 600
31. H.Bende, Chemie in unserer Zeit 8 ( 1974 ) 17
32. P.Cuatrecasas, Advances in Enzymology, 36 ( 1972 ) 29
33. P.Cuatrecasas, M.Wilchek, Ch.B.Anfinson  
Proc.Nat.Acad.Sci. 61 ( 1968 ) 636
34. P.Cuatrecasas, J.Biol.Chem. 245 ( 1970 ) 3059
35. G.Semenza, Chimia 14 ( 1960 ) 325
36. H.G.Boman, L.E.Westlund, Arch.Biochem.Biophys.  
64 ( 1956 ) 217
37. W.W.Ward, R.J.Fastiggi, Analytical Biochemistry  
50 ( 1972 ) 154
38. G.Bundschuh, J.of Chromatography 56 ( 1971 ) 241
39. S.Lewin, Biochemical J. 117 ( 1970 ) 41 P
40. B.J.Radola, H.Delincée, Biochim.Biophys.Acta  
200 ( 1970 ) 404
41. B.J.Radola, Biochim.Biophys.Acta 194 ( 1969 ) 335
42. B.J.Radola, Biochim.Biophys.Acta 295 ( 1973 ) 412
43. E.Valmet, Science Tools 16 ( 1969 ) 8
44. O.Vesterberg, H.Svensson, Acta Chem.Scand.  
20 ( 1966 ) 820
45. C.R.Parish, J.J.Marchalonis, Analytical Biochemistry  
34 ( 1970 ) 436
46. A.K.Dunker, R.R.Rueckert, J.Biol.Chem. 244 (1969) 5074
47. J.H.Hill, R.J.Shepherd, Virology 47 ( 1972 ) 817
48. K.Weber, M.Osborn, J.Biol.Chem. 244 ( 1969 ) 4406
49. H.Stegemann, Z.f.analyt.Chemie 252 ( 1970 ) 165
50. A.N.Glazer, Annual Rev.Biochem. 39 ( 1970 ) 101
51. A.Mühlrad, G.Hegyi, M.Horányi, Biochim.Biophys.Acta  
181 ( 1969 ) 184
52. C.G.Rosen, I.Fedorcsak, Biochim.Biophys.Acta  
130 ( 1966 ) 401
53. V.B.Melchior, D.Fahrney, Biochemistry 9 ( 1970 ) 251
54. H.Horinishi, Y.Hachimori, K.Kurihara, K.Shibata,  
Biochim.Biophys.Acta 86 ( 1964 ) 477
55. M.Sokolovsky, B.L.Vallee, Biochemistry 5 ( 1966 ) 3574
56. M.Sokolovsky, B.L.Vallee, Biochemistry 6 ( 1967 ) 700

57. G.Pfleiderer, Naturwissenschaften 54 ( 1967 ) 632
58. J.J.Holbrock, G.Pfleiderer, Biochem. Z. 342 ( 1965 ) 111
59. E.Wintersberger, Biochemistry 4 ( 1965 ) 1533
60. M.Merkenschlager, K.Schloßmann, W.Kurz Biochem.Z. 329 ( 1957 ) 332
61. Serva Cellulose Ion Exchangers, Heidelberg 1972
62. G.Beisenherz, H.J.Boltze, Th.Bücher, R.Czod, K.H.Garbade E.Meyer-Ahrendt, G.Pfleiderer, Z.f.Naturf. 8b(1953) 555
63. O.Warburg, W.Christian, Biochem.Z. 310 ( 1942 ) 384
64. H.Eggerer, F.Lynen, Liebigs Ann.Chemie 630 (1960) 58
65. J.T.Van Bruggen, Nucleonics 7 (3) ( 1950 ) 45
66. G.Popják, J.W.Cornforth, R.H.Cornforth J.Biol.Chem. 237 ( 1962 ) 56
67. C.Donninger, G.Popják, Biochem.J. 105 ( 1967 ) 547
68. K.Bloch, J.Biol.Chem. 234 ( 1959 ) 2595
69. R.A.Salokangas, H.C.Rilling, L.T.Samuels Biochemistry 3 ( 1964 ) 834
70. D.L.Nandi, J.W.Porter, Arch.Biochem.Biophys. 105 ( 1967 ) 547
71. C.S.Hanes, F.A.Isherwood, Nature 164 ( 1949 ) 1107
72. G.Fray, J.Frey, Bull.Soc.Chim.Biol. ( 1963 ) 1202
73. Whatman, Laboratory Manual, Advanced Ion-Exchange Celluloses, W.u.R.Balston Ltd., Maidstone, England
74. H.Merz, G.Pfleiderer, Th.Wieland, Biochem. Z. 342 ( 1965 ) 66
75. P.Andrews, Biochem.J. 96 ( 1965 ) 595
76. Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala
77. S.T.Nerenberg, G.Pogojeff, American J.of Clinical Pathology 51 ( 1969 ) 728
78. M.Sumper, Dissertation, Universität München 1970
79. H.R.Maurer, Diskelektrophorese, Walter de Gruyter Verlag 1968
80. Bedienungsanleitung für LKB 8101 Ampholine, LKB-Produkte AB, Stockholm
81. C.W.Wrigley in W.B.Jakoby, Methods in Enzymology XXII ( 1971 ) 561

### Lebenslauf

Am 3.Oktober 1943 wurde ich in Blaubeuren ( Kreis Ulm, Baden-Württemberg ) geboren. Meine Eltern sind Dr.Erwin Elhardt, Chemiker, und Margarete Elhardt, geb.Reiter.

#### Ausbildung:

|                        |                                                                                                                                                   |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sept. 1949 - Juli 1953 | Volksschule in München                                                                                                                            |
| Sept. 1953 - Juli 1962 | Oberrealschule an der Frühling-<br>straße in München                                                                                              |
| Juni 1962              | Reifeprüfung                                                                                                                                      |
| November 1962          | Beginn des Studiums der Chemie an<br>der Universität München                                                                                      |
| Juli 1965              | Diplom-Vorprüfung                                                                                                                                 |
| April 1968             | Diplom-Hauptprüfung                                                                                                                               |
| Sept. 1968 - Juli 1973 | Anfertigung der Diplom- und Doktor-<br>arbeit am Institut für Biochemie<br>der Universität München unter An-<br>leitung von Herrn Prof.Dr.F.Lynen |









